



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado  
Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y  
Geográfica  
Unidad de Posgrado

**Biorremediación del agua recirculante en el cultivo  
intensivo del camarón blanco, utilizando microbiota  
autóctona del ecosistema del mangle rojo**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias  
Ambientales

**AUTOR**

Wilson Cornelio TORRES RÍOS

**ASESOR**

Dr. Oscar Rafael TINOCO GÓMEZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Torres, W. (2019). *Biorremediación del agua recirculante en el cultivo intensivo del camarón blanco, utilizando microbiota autóctona del ecosistema del mangle rojo*. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Unidad de Posgrado, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

**CODIGO ORCID DEL AUTOR:**

0000-0002-4756-6373

**CODIGO ORCID DEL ASESOR:**

0000-0002-7927-931x

**DNI:**

000870954

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN:**

**INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:**

Recursos propios

**UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS:**

Extracción de microbiota autóctona del mangle rojo del estuario del río Chaguana. Cantón el Guabo-Provincia de El Oro- República del Ecuador. Coordenadas 03°05'46.98" S y 79°51'18.54" O. El procesamiento inicial en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala. La bioaumentación de la microbiota y la biorremediación del agua, en la unidad productiva acuicola CAMARCIELO, en la parroquia Chacras del cantón Arenillas-El Oro. Coordenadas 03°32'42.72" S y 80°12'02.28" O, en la zona fronteriza entre Perú-Ecuador.

**AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:**

06/2017 - 08/2019



# UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

FACULTAD DE INGENIERÍA GEOLÓGICA, MINERA, METALÚRGICA Y GEOGRÁFICA

UNIDAD DE POSGRADO



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

### SUSTENTACIÓN PÚBLICA

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Lima, a los nueve días del mes de agosto del 2019, siendo las 15:00 horas, se reúnen los suscritos miembros del JURADO EXAMINADOR DE TESIS, nombrado mediante Dictamen N.º 523/UPG-FIGMMG/2019 del 18 de julio del 2019, con la finalidad de evaluar la sustentación oral de la siguiente tesis:

#### TÍTULO

«BIORREMEDIACIÓN DEL AGUA RECIRCULANTE EN EL CULTIVO INTENSIVO DEL CAMARÓN BLANCO, UTILIZANDO MICROBIOTA AUTÓCTONA DEL ECOSISTEMA DEL MANGLE ROJO»

Que, presenta el Mag. **WILSON CORNELIO TORRES RÍOS**, para optar el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**.

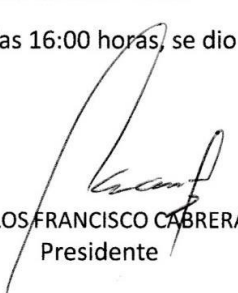
El secretario del Jurado Examinador de la Tesis, analiza el expediente N.º 03664-FIGMMG-2016 del 27 de mayo del 2016, en el marco legal y Estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y cumplió con las etapas del trámite según el «Reglamento de los Estudios de Maestría y Doctorado».

Luego de la Sustentación de la Tesis, los miembros del Jurado Examinador procedieron a aplicar la escala descrita en el Art. 61 del precitado Reglamento, correspondiéndole al graduando la siguiente calificación:

..... *muy bueno (18)* .....

Habiendo sido aprobada la sustentación de la Tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES** al Mag. **WILSON CORNELIO TORRES RÍOS**.

Siendo las 16:00 horas, se dio por concluido al acto académico

  
DR. CARLOS FRANCISCO CABRERA CARRANZA  
Presidente

  
DRA. ANA ASUNCIÓN HUAMANTÍNCO ARAUJO  
Secretaria

  
DRA. LEONOR MARGARITA RIVERA INTRIAGO  
Miembro

  
DR. OSCAR RAFAEL TINOCO GÓMEZ  
Asesor

## **AGRADECIMIENTO**

Mi reconocimiento imperecedero a las autoridades de la Universidad Mayor de San Marcos, concretamente de la Facultad de Ingeniería Geología, Minera, Metalúrgica y Geográfica, de forma especial al personal directivo, docente y dicente de la Unidad de Posgrado, en la persona de su director Dr. Carlos Cabrera Carranza por sus directrices emitidas durante el programa doctoral. El agradecimiento formal al Dr. Oscar Rafael Tinoco Gómez, por su asesoramiento en todas las instancias del proceso. A la Dra. Ana Huamantín Araujo, miembro del Tribunal Informante y Examinador por su asistencia especializada en la edición de la tesis. De igual forma a la Dra. Leonor Rivera Intriago, miembro del Tribunal Examinador.

Mi retribución permanente al Instituto de Ciencia y Biotecnología con sede en la Provincia de Tumbes, gerenciado por el Dr. Eric Mialhe, donde se ejecutó la primera fase de extracción del ADN. A la Empresa StarSEQ con sede en Mainz-Alemania, donde se realizó la secuenciación. Finalmente expreso mi gratitud a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala donde se realizaron los primeros ensayos en el tratamiento de la microbiota. Así como la Unidad Acuícola Camarcelo donde se efectuó la biorremediación en sus diferentes fases.

Al Instituto de Investigaciones de la FIGMMG, bajo la dirección del Dr. Francisco Alcántara Boza, quien autorizo la publicación del artículo científico de la tesis doctoral en la versión electrónica de la Revista Institucional correspondiente al Volumen 21 N° 42, 2018, ISSN VERSIÓN ELECTRONICA 1682-3087. Particularmente con afecto a la Dra. Livia Conde Maza y Lcda. Anita Conde Sarango por su colaboración técnica y metodológica en la redacción de la tesis.

Wilson Cornelio Torres Ríos.

**DOCTORANDO**

## **DEDICATORIA**

Con afecto y convencimiento esta investigación doctoral la dedico a mis estudiantes de las carreras Medicina Veterinaria y de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala. A mi familia que de una u otra forma entendieron el objetivo que me propuse al ausentarme del núcleo familiar. A mis hijos Wilson Vladimir, Bheidy Milene, Cecibel de Las Mercedes y Rubén Darío, razón fundamental en alcanzar la meta propuesta. De manera especial a la persona que me ha brindado su permanente apoyo afectivo durante el período académico y de investigación en los estudios de éste Doctorado, Livia Conde M.

Wilson Cornelio Torres Ríos, Mg.Sc

**DOCTORANDO**

## ÍNDICE GENERAL

	Págs.
<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Situación Problemática	1
1.2. Formulación del Problema	2
1.2.1. Problema General	3
1.2.2. Problemas específicos	3
1.3. Justificación Teórica	4
1.4. Justificación Práctica	5
1.5. Objetivos de la investigación	6
1.5.1. Objetivo general	6
1.5.2. Objetivo específico	6
<b>CAPITULO 2: MARCO TEORICO</b>	<b>7</b>
2.1. Marco Filosófico	7
2.1.1. Fundamentos Filosóficos en la investigación	7
2.1.2. Perspectivas Filosóficas medioambientales	9
2.1.3. Compatibilidad de la Filosofía Ambiental	11
2.1.4. Influencia de la Filosofía Ambiental en las Ciencias Ambientales	12
2.2. Antecedentes de la Investigación	12
2.2.1. Perspectivas de la producción en acuicultura	12
2.2.2. Impactos de residuos de los nutrientes en la producción acuícola	13
2.2.3. Alternativas de biorremediación en acuicultura	14
2.2.4. Asociación de comunidades bacterianas del ecosistema en la producción acuícola	16
2.2.5. Metagenómica aplicada en la acuicultura	17
2.3. Bases teóricas	19
2.3.1. Biorremediación en acuicultura	19
2.3.2. Buenas Prácticas de Biorremediación	21
2.3.2.1. Biorremediación de residuos orgánicos	21



2.3.2.2. Biorremediación de compuestos nitrogenados	22
2.3.3. Sistema de recirculación de agua en Acuicultura	23
2.3.4. Calidad de agua en acuicultura	24
2.3.4.1. Parámetros básicos que deterioran la calidad	25
2.3.4.2. Parámetros nitrogenados que afectan la calidad	28
2.3.5. Estándares de Calidad de Agua Acuícola	30
2.3.6. Características del ecosistema del mangle rojo	30
2.3.7. Microbiota natural en los organismos acuícolas	31
2.3.8. Fundamentos de Metagenómica	33
2.3.8.1. Metagenómica de Escopeta (ESS)	34
2.3.8.2. Secuenciación de alto rendimiento	36
<b>CAPÍTULO 3: METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
3.1. Tipo y diseño de la investigación	37
3.1.1. Tipo de investigación	37
3.1.2. Diseño experimental	37
3.2. Hipótesis	40
3.2.1. Hipótesis General	40
3.2.2. Hipótesis Específicas	40
3.3. Variables	41
3.3.1. Variable Independiente X	41
3.3.1.1. Dimensiones	41
3.3.1.2. Indicadores	42
3.3.2. Variable Dependiente 1	42
3.3.2.1. Dimensiones	42
3.3.2.2. Indicadores	42
3.3.3. Variable Dependiente 2	42
3.3.3.1. Dimensiones	42
3.3.3.2. Indicadores	42
3.4. Operacionalización de variables	43
3.5. Unidad de análisis	44
3.6. Población en estudio	46
3.7. Tamaño de la muestra	46

3.8.	Selección de la muestra	47
3.9.	Técnicas e Instrumentos de recolección de datos	48
3.10.	Análisis e interpretación de la información	49
3.10.1.	Clasificación, registro y codificación de datos	49
3.10.2.	Métodos y Técnicas Analíticas	50
3.10.2.1.	Procesamiento de la microbiota	50
3.10.2.2.	Técnica de Biorremediación del agua recirculante	50
3.10.2.3.	Biorremediación en la piscina de producción	51
3.10.2.4.	Metagenómica de la microbiota	52
<b>CAPÍTULO 4:</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
4.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	57
4.1.1	Monitoreo de parámetros fisicoquímicos previo a la biorremediación	57
4.1.2	Monitoreo de parámetros fisicoquímicos con biorremediación	59
4.1.3.	Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en la fase de experimentación	61
4.1.4.	Biodiversidad de la microbiota utilizada en la biorremediación	67
4.1.4.1	Secuencias procesadas 16S.	67
4.1.4.2	Secuencias asignadas en OTUS.	68
4.1.5.	Biodiversidad de las secuencias asignadas en Otus	69
4.1.6.	Biodiversidad de los niveles taxonómicos asignados en Otus	71
4.1.6.1.	Otus predominante en el nivel taxonómico Phylum	73
4.1.6.2.	OTUs predominante en el nivel taxonómico Clase	75
4.1.6.3.	OTUs predominante en el nivel taxonómico Orden	77
4.1.6.4.	OTUs predominantes en el nivel taxonómico de Familia	79
4.1.6.5.	OTUs predominantes en el nivel taxonómico de Género	81
4.1.6.6.	OTUs predominantes en el nivel taxonómico de	

Especie	83
4.2.    Contrastación de la Hipótesis	85
4.2.1. Verificación de normalidad	85
4.2.2. Verificación de hipótesis	86
4.3.    Discusión	89
4.3.1. Impacto de los residuos nitrogenados tóxicos	89
4.3.2. Biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón	90
4.3.3. Asociación de comunidades bacterianas en la producción acuícola	91
4.3.4. Biodiversidad metagenómica de la microbiota	91
4.3.5. Relación de la biodiversidad bacteriana identificada y los parámetros fisicoquímicos monitoreados	92
 CONCLUSIONES	 93
RECOMENDACIONES	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	104

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Monitoreo de parámetros fisicoquímicos del agua recirculante sin tratamiento en las fases previas del periodo de diagnóstico de la calidad de agua.....	58
<b>Cuadro 2.</b> Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua recirculante con tratamiento del canal recolector, sedimentador y reservorio durante el periodo de diagnóstico de la calidad del agua.....	60
<b>Cuadro 3.</b> Data condensada de la biorremediación del agua recirculante en la piscina de producción del camarón blanco durante el periodo de experimentación de 12 semanas.....	63
<b>Cuadro 4.</b> <i>Secuenciación del ADN de la microbiota utilizada en la biorremediación del agua recirculante en el cultivo de camarón blanco en cada una de las fases del proceso experimental.....</i>	68
<b>Cuadro 5.</b> Biodiversidad metagenómica de la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo de camarón blanco.....	70
<b>Cuadro 6.</b> Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) asignados a la microbiota utilizada en la biorremediación.....	72
<b>Cuadro 7.</b> OTUs predominantes por Phylum en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.....	74
<b>Cuadro 8.</b> OTUs predominantes por Clase en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.....	76
<b>Cuadro 9.</b> Otus predominantes por Orden en la microbiota autóctona y bioacumulada utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.....	78
<b>Cuadro 10.</b> OTUs predominantes por Familia en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.....	80
<b>Cuadro 11.</b> OTUs predominantes por Género en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo de camarón blanco.....	82
<b>Cuadro 12.</b> OTUs predominantes por Especie en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo de camarón blanco...	84

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua recirculante sin tratamiento del canal recolector, sedimentador y reservorio durante el periodo de diagnóstico de la calidad del agua.....	58
<b>Gráfico 2:</b> Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua recirculante con tratamiento del canal recolector, sedimentador y reservorio durante el periodo de diagnóstico de la calidad del agua.....	61
<b>Gráfico 3.</b> Microbiota bioaumentada utilizada en la biorremediación del agua recirculante en la piscina de experimentación del camarón blanco durante la fase de producción.....	64
<b>Gráfico 4.</b> Densidad de la siembra del camarón prejuvenil en la piscina de experimentación del camarón blanco durante la fase de producción.....	64
<b>Gráfico 5.</b> Monitoreo del Amonio en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.....	65
<b>Gráfico 6.</b> Monitoreo de Nitritos en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.....	66
<b>Gráfico 7.</b> Monitoreo de Nitratos en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.....	66
<b>Gráfico 8.</b> Monitoreo del Oxígeno Disuelto en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.....	67
<b>Gráfico 9.</b> Relación la riqueza metagenómica de la microbiota, los Otus asignado e índice de biodiversidad microbiana en las diferentes fases de la experimentación.....	71
<b>Gráfico 10.</b> Niveles Taxonómicos asignados a la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en las diversas fases de la experimentación.....	72

**Gráfico 11.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Phylum en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación.....73

**Gráfico 12.** . OTUs predominantes en el nivel taxonómico de Clase en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación..... 75

**Gráfico 13.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Orden en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas las fases de experimentación..... 77

**Gráfico 14.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Phylum en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas las fases de experimentación..... 79

**Gráfico 15.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Género en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación..... 81

**Gráfico 16.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Especie en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación..... 83

## RESUMEN

La actividad acuícola en el cultivo del camarón genera materia orgánica que al degradarse originan compuestos nitrogenados tóxicos como amonio, nitritos y nitratos, producto de la hidrodinámica agua-suelo-alimento, ocasionando impactos ambientales intrínsecos que afectan la calidad del agua, suelo, biodiversidad y nutrición del crustáceo. Estos impactos tratados químicamente fomentan el desequilibrio dinámico de los componentes que intervienen en los ciclos nutritivos, lo que amerita aplicación de estrategias que los minimicen.

La investigación tiene como objetivo determinar la actividad biorremediadora de la microbiota autóctona del ecosistema del mangle rojo, utilizada en la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco. Los resultados demuestran la eficacia de la microbiota en el proceso de biorremediación al disminuir y mantener en niveles óptimos los parámetros monitoreados en cada una de las fases de producción y evidencian que la biodiversidad microbiana no afecta la salud del crustáceo al mantener similares características metagenómicas.

Se concluye que la microbiota del mangle rojo actúa eficazmente en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco. Las especies más predominantes son: Unclassified, Uncultured bacterium y Lactobacilos. La técnica empleada evidencia la calidad del agua, salud animal, conservación del medio ambiente y rendimiento del producto.

## ABSTRACT

Organic matter and toxic compounds such as ammonium, nitrites and nitrates, originating in water-soil hydrodynamic activity and degraded metabolites from foods administered in the production of white shrimp, generate intrinsic environmental impacts that affect the chemical quality of water, soil conservation, nutrition of white shrimp and biodiversity, generating pollution problems that, when chemically treated, promote the dynamic imbalance of the physicochemical parameters that intervene in nutritive cycles, thus requiring the application of non-polluting strategies.

The objective of the research is to determine the bioremediation activity of the autochthonous microbiota of the red mangrove ecosystem (*Rizhophora Mangle*) extracted from the estuary of the Chaguana river, through the monitoring of toxic nitrogen parameters, to maintain the quality of the recirculating water in the cultivation of the white shrimp. The experimentation will also allow us to know the biodiversity of the bacterial consortium used in the bioremediation of water and the impact on the production of this crustacean in aquaculture farms.

The results obtained aim to directly and indirectly benefit the aquaculture production sector in order to maintain through this bioremediation process a quality of water in optimal conditions to obtain a quality product, with accessible investment costs, applying techniques that mine environmental impacts such as strategy to guarantee the food security of the population, socioeconomic development and the conservation of the environment.



## CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación Problemática

La producción acuícola a nivel mundial enfrenta serios problemas ambientales por el mal uso de los sistemas de producción, específicamente en las unidades de producción intensivas y semintensiva, generando un ambiente nocivo para las especies en cultivo, causado por la acumulación de materia orgánica, constituyendo un factor negativo en los diferentes ciclos de cultivos del camarón blanco específicamente.

En nuestro país, y de manera especial en la provincia de El Oro, así como en la región costera se han implementado instalaciones acuícolas de producción de camarón blanco (***Litopenaeus vannamei***), utilizando diversos sistemas recirculante de agua, con riesgos de generar impactos ambientales intrínsecos y extrínsecos negativos, originados por el aumento de la biomasa orgánica, con concentraciones excesiva de materia orgánica, que al degradarse generan metabolitos tóxicos como amonio, nitritos, nitratos, alteración del pH, consumo de oxígeno disuelto, que afectan la calidad química del agua, y por ende la producción del crustáceo, lo que va en dirección opuesta a las Buenas Practicas de Producción, como medio para garantizar la calidad del producto la preservación del medio ambiente y la biodiversidad de las especies bioacuáticas.

En la práctica de los sistemas de cultivos intensivos y semintensivos por recirculación de agua se ha intensificado el uso de determinados probióticos, que incluye consorcios bacterianos bioaumentados, que conlleva a obtener mayor rendimiento en la producción, así como disminuir la contaminación del agua y del suelo. **Verschuere y col (2000)**, definen a un probiótico como el “suplemento microbiano vivo que tiene efectos beneficiosos en el hospedador, modificando su flora asociada y la ligada al medio ambiente”. Más tarde, **Reid y col. (2003)** incluyen la frase “cuando son administradas en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable para el hospedador”.

Diversos estudios determinan que la microbiota autóctona, originada en un ecosistema, como el obtenido del mangle rojo de agua dulce, mantienen efectos probióticos que minimiza la concentración de metabolitos tóxicos, por lo que este material extraído puede ser utilizado como probiótico en forma de un consorcio bacteriano bioaumentado, con la finalidad de mantener niveles materia orgánica y sus metabolitos tóxicos, en concentraciones accesibles que no afecten la calidad química del agua, garantizando la producción del camarón blanco.

En este ámbito se estima que la aplicación de estrategias no contaminantes, destinadas a disminuir o eliminar la concentración de materia orgánica y sus metabolitos tóxicos, forma parte de los procedimientos de Buenas Prácticas de Producción (BPP). Entre las técnicas más utilizadas en este campo está la **Biorremediación**, definida por **Glazer y Nikaido (1995)**, como una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples, cuyo efecto tóxico es disminuido o eliminado.

## 1.2. Formulación del Problema

La materia orgánica y los compuestos tóxicos como amonio, nitritos y nitratos, originados en la actividad hidrodinámica agua-suelo y los metabolitos degradados a partir de los alimentos administrados en la producción del camarón blanco, generan impactos ambientales intrínsecos que afectan la calidad química del agua, la conservación del suelo, la nutrición del camarón blanco y la biodiversidad, generando problemas de contaminación que al ser tratados químicamente, fomenta el desequilibrio dinámico de los parámetros fisicoquímicos que intervienen en los ciclos nutritivos, por lo que amerita la aplicación de estrategias no contaminantes.

La investigación tiene como objetivo determinar la actividad biorremediadora de la microbiota autóctona del ecosistema del mangle rojo (*Rizhophora Mangle*) extraída del estuario del río Chaguana, a través del monitoreo de los parámetros nitrogenados tóxicos, para mantener la calidad del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco. La experimentación además nos permitirá conocer la biodiversidad del consorcio bacteriano utilizado en la biorremediación del agua y el impacto en la producción de este crustáceo en las granjas acuícolas. Con los resultados obtenidos se aspira beneficiar directa e indirectamente al sector productivo acuícola, manteniendo a través de este proceso biorremediador la calidad de agua en condiciones óptimas, capaz de obtener un producto de calidad, con costos de inversión accesibles, aplicando técnicas que minimicen los impactos ambientales como estrategia de garantizar la seguridad alimentaria de la población, el desarrollo socioeconómico y la conservación del medio ambiente.

### **1.2.1. Problema General**

¿De qué manera la microbiota autóctona del mangle rojo estimula la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco en las diversas fases del sistema de producción?

### **1.2.2. Problemas específicos**

**Problema específico 1.**

¿Cómo está constituida la microbiota autóctona del mangle rojo y la microbiota bioaumentada utilizada en la biorremediación del agua recirculante del cultivo del camarón blanco?

**Problema Específico 2.**

¿La biorremediación influye en la calidad del agua recirculante utilizando la microbiota autóctona del mangle rojo bioaumentada en el cultivo del camarón blanco?

**Problema específico 3.**

¿En qué medida la microbiota autóctona del mangle rojo bioaumentada estimula la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco?

**1.3. Justificación Teórica**

Desde la perspectiva científica, con la ejecución de la presente investigación se espera generar conocimiento, en lo relacionado a la utilización de microbiota autóctona del ecosistema del mangle rojo, en la biorremediación del agua recirculante en cultivos intensivos y semi-intensivo de camarón blanco, como estrategia de aplicar procesos de Buenas Prácticas de Producción, que garantice la calidad del agua, la producción acuícola, la seguridad alimentaria, la implementación de proyectos sostenibles, y la conservación del medio ambiente.

Constitucionalmente el proyecto se encuadra en la Filosofía del desarrollo sostenible, del buen vivir y la conservación del medio ambiente, tal como lo establece la Constitución de la República del Ecuador, capítulo 5, de la sección segunda del medio ambiente, en sus artículos 86, 87, 88, 89, 90 y 91; los artículos 266, 267 y 270, del Título XII, capítulo 6, del régimen agropecuario.

#### **1.4. Justificación Práctica**

En el ámbito práctico contribuye tecnológicamente al establecimiento de estrategia limpia en la producción acuícola, con técnicas naturales como es el uso de la microbiota autóctona del mangle rojo en la biorremediación del agua, fundamentada en la actividad degradativa de los microorganismos en el tratamiento de la materia orgánica y metabolitos tóxicos, que se originan en unidades de producción intensiva y semi-intensiva del camarón blanco con sistemas de agua recirculante, con la finalidad de desarrollar una explotación óptima y racional, mediante la ejecución de proyectos sostenibles, haciendo de ello un instrumento de cambio en la vida socio – económica y ambiental de sus actores.

Socialmente contribuye a desarrollar técnicas de producción verdes, que garantiza su calidad, comercialización interna y externa, acorde a las normas nacionales e internacionales sustentadas en la seguridad alimentaria, estimula la conservación de la biodiversidad acuícola y la preservación del medio ambiente. Económicamente el proyecto es viable, dado que su ejecución se realiza en una industria recientemente instalada, con infraestructura técnicamente adecuada, donde se aplica sistema de recirculación de agua cuya calidad química y cantidad es aceptable.

## **1.5. Objetivos de la investigación**

### ***1.5.1. Objetivo general***

Determinar que la microbiota autoctona del ecosistema del mangle rojo extraída del estuario del rio Chaguana, estimula la biorremediación del agua recirculante en el cultivo intensivo del camarón blanco.

### ***1.5.2. Objetivo específico***

1. Caracterizar la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.
2. Determinar si la bioaumentación de la microbiota autóctona del mangle rojo actúa en la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco.
3. Estimar la actividad de la microbiota autóctona del mangle rojo utilizada en la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco.

## **CAPITULO 2: MARCO TEORICO**

### **2.1. Marco filosófico**

#### ***2.1.1. Fundamentos filosóficos en la investigación***

Mario Bunge considera que la filosofía de la ciencia se basa en la concepción de que la naturaleza es regular, uniforme e inteligible y que el hombre es capaz de comprender la inteligibilidad de la naturaleza (1960). Jean-Marie Aubert. 1987, cita en su obra Filosofía de la Naturaleza, que las teorías científicas no son la simple y mera opinión de un autor, sino que requieren de un hecho o problema que interroga, una hipótesis, considerada como propuesta de respuesta, que se ha de verificar mediante el proceso de investigación, que permite verificar un hecho, que se convierte en ley científica, aplicable a casos semejantes. Esta ley, vinculada con otras similares, constituye la teoría que alimenta a una determinada ciencia.

Además considera que la teoría es un instrumento de la ciencia basado en diferentes tópicos que define la orientación de la ciencia en cuanto a:

1. Los diversos tipos de datos que han de abstraerse.
2. Plantea un esquema de conceptos por medio del cual se sistematizan, clasifican y relacionan entre sí los fenómenos pertinentes;

3. Resume los hechos en una generalización empírica, y en sistemas de generalización;
4. Predice hechos y señala los claros que hay en nuestro conocimiento.

Jean-Marie Aubert, considera que una teoría es cierta o no, en la medida que cuenta con una demostración verificable, basada en el método científico que permite mediante un proceso validarla o descartarla, fundamentado en dos hechos:

- a. La **reproducibilidad**: Definida como la capacidad de repetir un determinado experimento en cualquier lugar y por cualquier persona; lo cual se basa en la comunicación y publicidad de los resultados obtenidos.
- b. La **falsabilidad**: Capacidad de una teoría de ser sometida a potenciales pruebas que la contradigan. (K. Popper).

**Karl Popper (1902-1994)**, fue participante del Círculo de Viena que impulsaba Filosóficamente el Neopositivismo, siendo crítico esta postura en su obra “La lógica de la investigación científica” (1934). Popper expuso un apasionamiento por un racionalismo crítico, que postulaba que la ciencia no es capaz de verificar si una **hipótesis** es cierta, pero sí puede demostrar si ésta es falsa. Por eso no sirve la inducción, pues por mucho que se experimente, nunca se podrá examinar todos los casos posibles, y basta con un solo contraejemplo para echar por tierra una teoría por lo que proponía el falsacionismo frente al verificacionismo. En 1934, recomendó a la ciencia el método hipotético deductivo, basado en que la ciencia no elabora enunciados ciertos a partir de datos, sino que propone hipótesis que luego somete al filtro experimental para detectar los errores a través del método científico, que comprende las siguientes etapas:

- a. La observación del fenómeno;
- b. Determinación del problema;
- c. Formulación de hipótesis;



- d. Diseño experimental;
- e. Análisis de los resultados; y,
- f. Conclusiones.

### ***2.1.2. Perspectivas Filosóficas medioambientales***

La expansión de la conciencia ambiental en los últimos treinta años del siglo XX, influye ampliamente en el ámbito medioambiental, orientada a la Filosofía Ambiental o Eco Filosofía, considerada como una área de la ciencia epistemológica consolidada con el aporte filosófico de pensadores como: Arne Naess, George Sessions, Bill Devall, Alan Drengson, Freya Mathew, Michel Sèrres, Ricardo Solé, John Passmore, Alicia Bugallo, James Wilson, entre otros.

La Eco Filosofía como ciencia abarca conceptos básicos de la ecología como la complejidad, la diversidad y la simbiosis, que junto a los estilo de vida ecológicos han inspirado, sugerido y fortalecido su perspectiva, aunque ciertas propuestas medioambientales han generado severas críticas, respecto a que los estilo de vida y la población humana son las claves del impacto negativo sobre la biosfera.

Sèrres (1991), afirma que la Eco Filosofía constituye un diagnóstico del impacto humano sobre el mundo, no humano que en términos cuantificables es excesivo, generando una curva ascendente que estimula la generación de impactos ambientales negativos, que en términos ecológicos debería reducirse, para evitar la destrucción de los hábitats como consecuencia del accionar humano, como tala de bosques templados y tropicales, sobrepastoreo, desecación de humedales, contaminación de las aguas marinas y continentales.

Filosóficamente se establece que los seres vivos humanos, y no humanos tienen, al menos, un tipo de derecho en común, que es el derecho a vivir y

florecer. (Naess. 1991). Esta afirmación reconoce la dependencia vital del ambiente biosférico, como condición de existencia de todo ser vivo, que no ha sido creada por el, y que es anterior a la emergencia evolutiva de la misma especie humana.

Entre los principios básicos de la ecología profunda, se destaca que el bienestar y el florecimiento de la vida humana y no humana en la Tierra tienen un valor en sí mismo. Por tal motivo, los humanos no tienen derecho a reducir esta riqueza y diversidad, salvo para satisfacer necesidades vitales, de modo sustentable, según el enfoque epistemológico de la filosofía ambiental, que promueve la implementación de cambios a nivel ideológico, político, económico y tecnológico. (Bugallo, 2002).

Este enfoque determina que la crisis ambiental es un problema de dimensión social, entendiendo por tal la ocurrencia de situaciones que obstaculizan el normal desarrollo y funcionamiento de la comunidad, para lo cual se requiere reducir la incidencia o gravedad del factor perturbador, que origina la creciente contaminación del medio ambiente desde diferentes ámbitos. Esta concepción orienta a una postura reformista, que supone activar medidas económicas, políticas, administrativas, científicas, y tecnológicas. (Passmore, 1974).

Desde este ámbito filosófico se plantea la presencia de la biología de la Conservación, como un proceso medioambiental que aplica principios de diversas disciplinas, tales como ecología, biogeografía, genética de poblaciones, economía, sociología, antropología, entre otras, que incita a la aplicación de un sistema conservacionista tradicional, en contraposición al preservacionismo estricto que se limita al entorno de bienes disponibles para el uso humano. (Gifford Pinchot). Para fines de los años sesenta del siglo pasado el conservacionismo activo, integra la protección y el uso sustentable del medio ambiente con toda su diversidad biológica, lo que reconforta las tendencias de la 'Filosofía de la Conservación'. En contraposición a fines del mismo siglo se habla del "Funcionalismo", que estudia a la naturaleza desde

el ámbito funcional del ecosistema, que igualmente considera al hombre como parte de la naturaleza. En este entorno se hace referencia a conceptos como servicio ecológico, rehabilitación ecológica, sustentabilidad ecológica, desarrollo sustentable, salud del ecosistema, manejo de ecosistemas, especie clave, etc. (Callicott, Crowder, Mumford, 1997).

### ***2.1.3. Compatibilidad de la Filosofía Ambiental***

Para fines del siglo pasado se establece filosóficamente la compatibilidad de la biología de la conservación y sus estrategias, con el enfoque por ecosistemas generalizando los enfoques de biosfera y biodiversidad, substituyendo a conceptos como naturaleza o mundo silvestre. Desde esta óptica científica la Biología de la Conservación, se considera como una nueva ciencia multidisciplinaria desarrollada frente a la crisis de la diversidad biológica, que tiene como objetivos investigar los impactos humanos sobre la biodiversidad y ensayar procedimientos que impidan la extinción de especies (Soulé, 1985, 1986, Wilson, 1992).

En este contexto la Eco Filosofía mantiene la tendencia a la preservación estricta del medio ambiente como un espacio natural para las especies y la biodiversidad. Por otro lado la Ecología profunda sostiene que la preservación conlleva serios conflictos a nivel teórico como práctico. En este sentido, la expansión de políticas de preservación estricta amenaza la supervivencia cultural y física de pueblos campesinos o indígenas en América Latina y Caribe, África y Asia. (Gallopín, 1995). Esto plantea serios conflictos sobre todo en países en desarrollo, y mientras no se produzca la drástica disminución de la población humana que añora la ecología profunda, habrá que encontrar formas de conservación compatibles con la realidad social presente. (Callicott, Nelson, 1998).

#### ***2.1.4. Influencia de la Filosofía Ambiental en las Ciencias Ambientales***

El ámbito de aplicación de la Filosofía Ambiental ha marcado una gran influencia sobre las ciencias ambientales, con mayor énfasis en el entorno de la Biología de la Conservación, que se basa en los componentes de campo y la intencionalidad de la ciencia aplicada. (Michel Soulé. 1985). Esta nueva dimensión del trabajo ecológico va más allá de la prueba de hipótesis y de la consistencia lógica como criterios de validación científica, y enfatiza las relaciones entre el contexto histórico social, la formulación de explicaciones científicas y el tipo de relación con la naturaleza.

La comprensión del rol esencial de la biodiversidad en el sostenimiento de todo proceso biótico hace que no pueda tratársela ya como un mero hecho; la idea de biodiversidad es un 'hecho' que no puede separarse de su valoración como un bien positivo. Esta apreciación del término biodiversidad es aceptada por diversos seguidores de la biología de la conservación y por filósofos ambientales, que sostienen que la biodiversidad es valiosa en la medida que evoluciona el sistema medioambiental.

Evidentemente la ecología queda tan ligada a la ética, pues del modo en que concebimos la naturaleza condiciona cómo la tratamos. Dice Rozzi en el artículo mencionado: para observar tal extensión de modos de vida y experimentar la inagotable diversidad de percepciones frente a esta asombrosa ramificación de expresiones bióticas y culturales, es necesario desembarazarnos de los números y de otros conceptos universales e ir al encuentro directo con cada ser vivo, humano o no humano.

## **2.2. Antecedentes de Investigación**

### ***2.2.1. Perspectivas de la producción en acuicultura***

Moriarty, (1999), considera que la actividad acuícola es un medio eficiente en la producción de alimentos, basado en la relación existente entre los policultivos de sus especies y estos con el medio ambiente, donde se incluye las granjas piscícolas que hoy en día mantienen diversas formas de tecnología.

Ravichandran y Jalaludin, (2001), estiman que la producción de residuos físicos, químicos y biológicos, originados por la actividad acuícola contaminan el ecosistema con impredecibles consecuencia para la salud de las especies bioacuáticas y su productividad, con énfasis en el cultivo de camarón por su exposición en los estanques a los compuestos tóxicos, que causan estrés oxidativo y en última instancia riesgos de desarrollar patologías de origen hídrico.

Leong y Fryer, (1993), hace un enfoque al costo de la producción acuícola, que en la última década se ha convertido en un problema para la viabilidad económica de las granjas piscícolas marinas, ya sea por sistemas de cultivos intensivo o semi- intensivo en el Mediterráneo. Refiere estadísticamente que al menos un 10% de la producción, son susceptibles de pérdida por acción letal de la microflora patógena propia del ecosistema, como resultado de falta de tratamiento de los suelos y de la calidad de agua.

### ***2.2.2. Impactos de los residuos de los nutrientes en la producción acuícola***

Investigaciones realizadas por Ruby Montoya en Ecuador “**El papel de las bacterias en las estrategias de alimentación y manejo en sistemas acuícolas**”, expone la importancia en conocer la dinamica del nitrógeno y sus metabolitos, considerando las altas concentraciones de amoníaco que excretan las especies cultivadas, como producto de metabolismo de los nutrientes y en intercambio metabólico con la flora bacteriana del agua y del

suelo, con graves riesgos por los compuestos tóxicos que esta actividad genera.

Michele A. Burford, Kevin C. Williams, publicaron sus estudios relacionados al **“Destino de los desechos nitrogenados de la alimentación del camarón”**. En la publicación se hace énfasis al problema que se origina por la presencia del Nitrógeno Soluble (NS) proveniente de la alimentación; la excreción de las especies bioacuáticas la lixiviación de alimento formulado, y la lixiviación de heces del camarón. En el estudio se cuantificó altas concentraciones de nitrógeno disuelto en el sedimento, en residuos de camarón y en las heces fecales en forma de urea. La Urea lixiviada fue utilizada por la comunidad microbiana en el estanque de agua, lo que al parecer el nitrógeno orgánico proveniente de lixiviados del alimento, es poco probable que tenga un impacto significativo en la calidad del agua. Se concluye que el nitrógeno disuelto mejora la calidad del agua, reduciendo las descargas de nutrientes de cultivo de camarón, mediante la disminución de la sobrealimentación, y la mejora de la retención alimentaria del camarón.

### ***2.2.3. Alternativas de biorremediación en acuicultura***

J. Paniagua, J. Michel, O. García, desarrollaron estudios relacionados a **“Biorremediación in situ de efluentes de cultivo de camarón utilizando tapetes microbianos contruidos”**. La problemática planteada estuvo referida a la industria camaronera de los países costeros, respecto a la eliminación de residuos de efluentes en el mar. Para su ejecución se diseñaron tapetes microbianos de lana de vidrio, con la finalidad de inmovilizar los consorcios microbianos marinos, para mitigar los niveles del nitrógeno disuelto de un efluente de cultivo de camarón. Los resultados revelaron la eficiencia del sistema en la disminución del nitrógeno amoniacal en un 97% y del 95% para los nitratos, en un período de 20 días de tratamiento, donde además se evidenció la reducción de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5).

Antonio y R. Philip, desarrollaron estudios en **“Biorremediación en sistemas de cultivo de camarón”**, donde exponen que la práctica de la acuicultura genera residuos provenientes del metabolismo de los nutrientes, del material residual de los alimentos, de las materias fecales degradadas, así como de insumos residuales profilácticos y terapéuticos, con alto riesgo para la salud de las especies. Los resultados revelaron la disminución de esta contaminación, por la actividad que ejercen las bacterias biorremediadoras en la oxidación de los residuos orgánicos, por acción de los procesos de Nitrificación y Denitrificación, que se desarrolla en los estanques manteniendo la biodiversidad y estabilidad de la comunidad. Concluye la investigación que en forma natural y comercial existe una notable variedad de productos probióticos que pueden ser utilizados en los sistemas de producción de camarón como biorremediadores de la calidad del agua, especialmente bacterias indígenas y consorcios bacterianos de géneros *Nitrosomas*, *Pseudomonas*, bacterias desnitrificantes, fotosintéticas, entre otras especies.

Mendoza O. En su investigación titulada **“Utilización de bacterias nitrificantes como biorremediadores del agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Tumbes – Perú”**, ejecutado entre junio y agosto del 2009, orienta su objetivo general a evaluar los microorganismos que nitrifican la materia orgánica presente en el agua de cultivo de camarón blanco, utilizando varios cebadores para individuos y genes nitrato- reductasa. La metodología se desarrolló simultáneamente con 5 tratamientos con diferentes tipos de geotextil, donde se fijan las bacterias nitrificantes con bioaumentación de nutrientes, y azúcares como fuente de carbono, dosificados en función de la densidad de siembra y biomasa de nutrientes. Los resultados de los parámetros monitoreados fluctuaron de acuerdo a lo siguiente: Temperatura de 23 a 24,5°C, salinidad de 35 a 40 ppm, pH entre 7,44 a 9,04, amonio 0,005 a 0,36 ppm, nitritos entre 0,03 a 22,36 ppm, nitratos de 0,25 a 13,0 ppm y fosfatos 0,46 a 4,99 ppm. Se concluyó que el mejor tratamiento se obtiene con presencia de bacterias nitrificantes. Los análisis de la comunidad microbiana del ADN, se ejecutaron mediante PCR,

con migración electroforética, indican la presencia de géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

#### ***2.2.4. Asociación de comunidades bacterianas del ecosistema en la producción acuícola***

Marlon Córdoba, Claudia Arango, Raúl Sarabia y Oscar D. Solano. James Cook, difunden su investigación titulada **“Biota asociada a las raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle*) en la Bahía de Cispotá y la Ciénaga La Caimanera, Caribe Colombiano”**. 1977. Plantearon como objetivo suministrar conocimiento de los patrones de distribución y abundancia de las comunidades de fauna que habitan las raíces de mangle rojo (*Rhizophora mangle*) de Bahía Cispotá y de la Ciénaga La Caimanera en el Golfo de Morrosquillo en el caribe Colombiano. En Bahía Cispotá se muestrearon 6 estaciones y en la Ciénaga 4. Se evaluó la temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, conductividad, sólidos suspendidos, sólidos disueltos y materia orgánica. La microbiota de las raíces de 10 muestras se analizó por técnicas multivariadas, índices ecológicos y pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas. Las dos zonas presentaron diferencias significativas en la temperatura, salinidad y sólidos disueltos y temperatura. Respecto a la fauna, se identificó un total de 8.456 individuos entre poliquetos, crustáceos, moluscos y peces principalmente.

Víctor H, Rivera, Luis A Torres. Nixon Bahamon, Robert Twilley, en su investigación titulada **“El uso potencial de los manglares como fuente de nitrógeno en acuicultura en efluentes de los estanques de camarón: El papel de la desnitrificación”**. El problema se relacionó al desconocimiento del potencial de nitrógeno acumulado en el sedimento del manglar. Para ello se evaluó en efluentes de los estanques de cultivo de camarón a lo largo de la costa caribeña colombiana entre, la concentración del nitrógeno y su potencial de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN). La media de las concentraciones de amonio total en la descarga de agua para todas las



granjas fueron significativamente mayores a 67  $\mu\text{g/L}$ , en el estuario adyacente se detectó un 33  $\mu\text{g/L}$ .

Estudios realizados por Tessy Peralta Ortiz en su tesis doctoral **“Identificación de especies bacterianas en el sistema radicular de *Rhizophora mangle*, en el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes, 2012**. Planteo como objetivo la identificación de especies microbianas en las raíces del mangle rojo. La metodología se fundamentó en la siembra microbiológica de muestras del raspado del sistema radicular de ***Rhizophora del mangle rojo***, en medios de cultivo específicos de: TCBS, TSA, Cetrimide, Mac Conkey y Endo. Las muestras inoculadas se sometieron al periodo de incubación que permitió identificar las características morfológicas de las unidades formadoras de colonias de acuerdo a la naturaleza del medio de cultivo. Las muestras con unidades formadoras de colonias bacterianas típicas fueron seleccionadas, purificadas y aisladas, para la extracción de su ADN, a través del proceso biomolecular denominado Prueba en Cadena de la Polimerasa (PCR) y valoradas con la técnica estándar de electroforesis. El ADN, fue amplificado utilizando un amplicon, para luego ser sometido a la secuenciación mediante el programa MEGA. La secuenciación permitió identificar una gran biodiversidad de flora microbiana donde predominaron especies bacterianas como: *Bacillus Pumilus*, *B. megaterium*, *Bacillus sp.*, *B. aryabhattai*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Exiguobacterium sp.*, y *Staphylococcus epidermidis*, la bacteriano cultivable Firmicutes y otras especies no cultivables.

### ***2.2.5. Metagenómica aplicada en la acuicultura***

Investigación publicada por A. Ghosh, N. Dey, A. Bera, A. Tiwari, K. Sathyaniranjan, K. Chakrabarti, D. Chattopadhyay. **“Análisis molecular independiente de la cultura de comunidades bacterianas en los sedimentos de manglar de Sundarban-India”**. Exponen que el mayor

problema en Sundarban es la acumulación de sedimentos costeros que comprende del bosque de manglar de aproximadamente un millón de hectáreas en las partes del sudeste de la India y partes del sur de Bangladesh, siendo la diversidad microbiana en este sedimento desconocida. El objetivo de la investigación es comprender la diversidad microbiana en este sedimento utilizando una aproximación molecular de cultivo independiente. Los resultados permitieron establecer genotecas de ARNr y 16 S, la secuenciación parcial de los clones seleccionados se llevó para identificar cepas bacterianas presentes en el sedimento. El análisis filogenético de genes reveló la diversidad de cepas bacterianas en el sedimento de Sundarban. Las principales familias de bacterias detectadas fueron proteobacterias (alfa, beta, gamma y delta), Flexibacteria (grupo CFB), Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, y Planctomycet.

Investigadores del Centro de Energía Nuclear en Agricultura de la Universidad de Sao Paulo, Paulo de Góes, Universidad de Río de Janeiro-Brasil, publicaron la investigación **“La abundancia y la diversidad genética de las secuencias de genes nifH, en 2 sedimentos de manglar brasileños afectados por factores antropogénicos”**. La investigación se fundamenta en estudios basados en el gen nifH, a través de transectos de sedimentos de dos sistemas de manglares situados a lo largo de la línea de costa del estado de Sao Paulo (Brasil), diferenciados uno de otro por el grado de perturbación, proveniente de la contaminación por derrame de petróleo y un manglar afectado por actividades del hombre. Las comunidades fueron evaluadas por PCR, donde se determinó que los genes de nifH, son similares en los dos sistemas de sedimentos del manglar. El estudio permitió detectar un grupo único desconocido “manglar-específico” de secuencias Mgv42 nifH. Los investigadores concluyeron que las comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno son parcialmente endémicas en la diversidad de bosques de manglares, cuya biodiversidad estaría influenciada en cuanto a sus características metagenómicas fundamentalmente por la presencia de la materia orgánica y la variedad de diversos elementos biológicos o no que forman parte del ecosistema.

Mendoza O., publica la investigación titulada “**Genómica estructural de la microbiota de los efluentes del cultivo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) Tumbes-Perú**”, donde se expone ampliamente la temática de la Metagenómica, a partir de la caracterización de comunidades microbianas originadas del proceso de nitrificación-desnitrificación, que se fija a los sustratos sumergidos en el agua de los efluentes del cultivo de camarón blanco. El objetivo se centró en identificar la diversidad microbiana presente en los efluentes del cultivo del camarón patiblanco a través de técnicas de biotecnología molecular que permiten en un alto grado los estudios metagenómicos ambientales desplazando a los cultivos tradicionales, cuyos resultados distan totalmente de las técnicas biomoleculares. La metodología se basó en la colocación de material geotextil en los tanques de cultivo de camarón pos siembra, para facilitar la fijación de bacterias presentes en el agua. La microbiota autóctona fijada en el material geotextil fue aislada para extraer su ADN, ser replicado por PCR, utilizando iniciadores ribosómicos 16S, para su secuenciación posterior. La secuenciación metagenómica identificó diversidad de familias, géneros y especies de bacterias, arqueas, viridiplantae, protozoario y fungis. Se concluyó que la evolución de la microbiota por factores intrínsecos incrementa notablemente la biodiversidad de acuerdo al índice de diversidad de Simpson y de Shannon.

## **2.3. Bases teóricas**

### ***2.3.1. Biorremediación en acuicultura***

En estas últimas décadas investigaciones en el ámbito de la acuicultura, fueron orientados a la implementación de estrategias alternativas para el cultivo del camarón, mediante la manipulación de comunidades microbianas

en el ecosistema. Entre estas estrategias en la producción acuícola, se han desarrollado procesos de **biorremediación** fundamentados en la utilización de comunidades microbianas con actividad degradativa que permiten la recuperación de ambientes contaminados ligados a la biodisponibilidad del biorremediador. (Benavides et al. 2006, Raiger y López, 2009).

Se define a la **Biorremediación**, como una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras, para transformar contaminantes orgánicos en compuestos simples no contaminantes. Estas técnicas se pueden utilizar para descontaminar suelos, aguas y otros ambientes. El uso de suplementos como agua y nutrientes, en un sistema aeróbico se conoce como Biorremediación con bioaumentación. (Glazer y Nikaido, 1995).

El efecto biorremediador se manifiesta notablemente con el mejoramiento de la calidad del agua, debido a la menor acumulación de materia orgánica en el fondo de los estanques, mejor penetración de oxígeno en el sedimento y ambiente favorable para la producción del camarón. (Rao y Karunasagar, 2000).

La implementación de procesos de biorremediación del agua en acuicultura permite el aprovechamiento de la productividad primaria estimulando la producción del camarón y otros cultivos secundarios mantiene la diversidad y estabilidad de la comunidad microbiana en los estanques, e implica optimizar las tasas de nitrificación para mantener baja concentración de amoníaco, estimular mecanismos de desnitrificación para eliminar el exceso de nitrógeno de los estanques en su estado gaseoso, maximizar la oxidación del azufre para reducir la acumulación de sulfuro de hidrógeno, desarrollar la mineralización del carbono para minimizar la acumulación del dióxido de carbono. (Bratvold et al. 1997).

En la actualidad se implementa técnicas de **Biorremediación**, apoyadas en los resultados de la metagenómica ambiental que permite analizar

molecularmente las comunidades microbianas presentes en el sedimento de los estanques de producción, como estrategia para el seguimiento del impacto de la materia orgánica sobre los ecosistemas, y la limpieza de ambientes contaminados por material residual y antropogénicos.

### **2.3.2. Buenas Prácticas de Biorremediación**

Para que la degradación de un contaminante pueda producir un eficaz efecto biorremediador, se requiere la interacción de la célula en el medio acuoso para dar lugar a la integración metabólica sustrato-enzima, que estimula la cinética enzimática, para degradar los compuestos tóxicos. Los mecanismos de reacción bioquímica están ligados a la biodisponibilidad de los biorremediadores, y estos a la afinidad electroquímica de sus componentes moleculares de los contaminantes. Se trata de un factor que en ciertos casos limita la biodegradación y en otros reduce la toxicidad de los contaminantes, por lo que además se conoce como técnica de bioaumentación. (Major et al., 2002).

La aplicabilidad de las técnicas de Buenas Prácticas de Biorremediación (**BPB**) está sujeta a varios factores medioambientales:

- a) Propiedades del contaminante (Biodegradabilidad).
- b) Consorcios microbianos con capacidad enzimática (Biocinética).
- c) Origen autóctono de los microorganismos (Atenuación).
- d) Bioaumentadores para mejorar la degradación (Bioaumentación).

#### **2.3.2.1. Biorremediación de residuos orgánicos.**

Químicamente la materia orgánica disuelta o suspendida en el agua, esta estructurada por cadenas carbonadas cortas generalmente polipépticas, favorable para la reproducción microbiana que tiene su habitat natural en el sedimento de los estanques de los cultivos de camarón, favoreciendo la capacidad enzimática para degradar residuos orgánicos, que a su vez

disminuye los impactos negativos de la contaminación del agua originadas por la formación de metabolitos tóxicos. Generalmente la actividad bioquímica de la microbiota en los estanques de cultivos de camarón mantiene concentraciones bajas de especies del género *Bacillus* que actúan como biorremediador, por lo que se requiere adicionar al agua consorcios bacterianos que compitan con la flora bacteriana natural y la materia orgánica provenientes de lexiviados, alimentos, heces fecales del camarón. (Sharma 1999).

#### **2.3.2.2. *Biorremediación de compuestos nitrogenados.***

La aplicación de alimentos nitrogenados en los estanques de cultivos de camarón, en cantidades excesivas a su capacidad de asimilación, estimula la acumulación de los metabolitos degradados como amoníaco y nitritos, que generalmente son altamente tóxicos para peces y camarones, (Ayyappan y Mishra 2003).

La biorremediación del exceso de amoníaco en los sistemas cerrados del cultivo de camarón, se logran por el proceso de nitrificación para lo cual se establece biofiltros de arena y grava a través del cual el agua circula. Entre los microorganismos oxidantes del amoníaco se consideran cinco géneros. *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus*, *Nitrolobus* y *Nitrospira*, mientras que bacterias de los géneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, y *Nitrospira*, actúan como oxidantes de los nitritos. (Ayyappan y Mishra 2003).

La concentración del amoníaco como tal puede afectar directamente la tasa de nitrificación, para oxidar nitrógeno que aumenta proporcionalmente, en función de la concentración del amoníaco, se asume que la relación es de al menos 3 ppm. Esta proporcionalidad al decrecer, estimula el incremento de la concentración del nitrógeno amoniacal total (TAN). (Ebeling, 2000).

La descomposición de los compuestos nitrogenados es importante en sistemas de recirculación de agua en acuicultura debido a la toxicidad del amoníaco, los nitritos y en menor grado los nitratos. El proceso de remoción

del nitrógeno amoniacal en un filtro biológico se denomina nitrificación. (Wheaton, 1985). Paralelamente se presenta un proceso de reducción anaeróbica de nitrato a nitrógeno molecular gaseoso denominado desnitrificación.

La nitrificación es un proceso bioquímico que permite la eliminación del amoníaco, específicamente en actividades acuícolas con sistemas cerrados de recirculación de agua, donde intervienen bacterias oxidantes que estimulan la formación de nitritos al reaccionar con el agua, con alteración del pH, en un medio ácido, con lo cual facilita la disponibilidad de material soluble. Los géneros que intervienen son: Nitrosomas, Nitrosovibrio, Nitrosococcus, Nitrolobus y Nitrospira. (Chanu, Mandal, 1991). El proceso de Nitrificación en los estanques de cultivo del camarón, acumula nitratos por oxidación del nitrito, cuando hay ausencia de biofiltros que estimulen la desnitrificación que convierte el exceso de nitrato en nitrógeno en forma de gas, donde intervienen bacterias del género Nitrobacter.

La filtración biológica puede ser una medida efectiva para controlar el amoníaco; en comparación con el recambio del agua que manteniendo niveles bajos. Existen dos tipos de bacterias que colectivamente ejecutan la nitrificación, clasificadas como bacterias quimioautótrofas, ya que obtienen la energía de la oxidación de compuestos inorgánicos a diferencias de las bacterias heterótrofas, que obtienen energía oxidando compuestos orgánicos (Hagopian, Riley, 1998).

### ***2.3.3. Sistema de recirculación de agua en Acuicultura***

Los sistemas intensivo y semi-intensivos de camarón blanco, es ampliamente empleado por las diferentes unidades de producción acuícola y consisten en la utilización de un elevado flujo abierto con la finalidad de proveer a las especies lo siguiente:

- a) Proporcionar oxígeno a las especies bio-acuáticas.
- b) Facilitar la eliminación de desechos del metabolismo de las especies con el propósito de evitar se acumulen en los estanques de cultivo.

Para cumplir con esta finalidad se utilizan diversos sistemas de circulación y recirculación de agua, ya sea a través de cerramientos, tanques, estanques, u otros sistemas, que faciliten la reutilización del agua tanto en volumen como en calidad y para lo cual se requiere un estricto control de la calidad.

El volumen de agua requerido para sistemas intensivo y semi intensivo de cultivo de camarón blanco es considerable, debido a los recambios que debe aplicarse periódicamente durante el día, dependiendo del comportamiento de la calidad del agua, específicamente de parámetros nitrogenados que causan toxicidad al camarón convirtiéndose en un factor de riesgo para la salud acuícola de la especie. Diversas unidades de producción tienen inconvenientes con acceso de agua de abastecimientos de calidad favorable para el cultivo de camarón blanco por lo que se ha impulsado los cultivos intensivos con sistemas de recirculación de agua que permite recambio de un volumen determinado no mayor al 10%. Este recambio facilita prevenir los efectos negativos de la evaporación, lavado y purgado de los desechos sólidos. (Lai & Klontz 1980, Lucchetti & Gray (1988).

Actualmente se ha intensificado la utilización de sistemas de reutilización del agua, debido a la probabilidad de disminuir impactos ambientales negativos, debido al efecto minimizado de residuos orgánicos provenientes de los cultivos y la calidad del agua.

#### ***2.3.4. Calidad de agua en acuicultura***

La calidad de agua se define como las características físicas, químicas y biológicas que se presenta por efectos de compuestos sólidos o líquidos, en suspensión o disueltos, la que depende del objeto al que se va a destinar la



granja acuícola, así como su ubicación geográfica, zonas de descargas, capacidad de bombeo, tipos y dosis de fertilizantes. (Egna y Boyd (1997).

Las Buenas Prácticas de Producción Acuícola (BPA), sugieren el manejo apropiado de la calidad del agua en los estanques de cultivo de camarón, ya sea por sistemas intensivo o semi intensivo, en circuitos abiertos o cerrados de recirculación del agua, en zonas costeras, o tierra adentro, debido a su incidencia en las actividades acuícolas productivas, técnicas, o sanitarias. Las especies acuícolas específicamente peces y camarones, están expuestos a la exposición de niveles no apropiados de oxígeno disuelto, amonio no ionizado, nitrito o ácido sulfhídrico, que conlleva a desarrollar estrés oxidativo y enfermedades de origen o transmisión hídrica. No obstante, en el ambiente complejo y dinámico de los estanques acuícolas, los parámetros de calidad del agua también se influyen entre sí (Mayer, E. 2012).

#### **2.3.4.1.      *Parámetros básicos que deterioran la calidad.***

Los parámetros básicos que deterioran la calidad del agua permiten corregir de forma inmediata alteraciones que se presenten en relación a la calidad del agua, dada la facilidad para su monitoreo en cualquier circunstancia por lo que se considera como indicadores básicos de fácil interpretación.

#### **1.      *Temperatura***

En las aguas acuícolas tienen graves repercusiones en la calidad física del agua, en los estanques de producción, considerando que las especies como crustáceos y peces, no tienen la capacidad propia de regulación de su temperatura corporal, y ésta depende del medio acuático en que viven. La temperatura incide en la actividad de ciertos parámetros, como evaporación, solubilidad de gases, degradación de materia orgánica, oxidación de compuestos nitrogenados. (Welch, 1952).

## **2. Turbidez**

Depende del material en suspensión, sea de origen mineral u orgánico, que le otorga el grado de turbiedad de acuerdo a la naturaleza, tamaño y cantidad de partículas suspendidas. La turbidez originada por el plancton presente en el agua, es una condición necesaria en acuicultura, a mayor concentración del plancton mayor grado de turbidez. En estanques de producción acuícola la turbidez causada por partículas de arcilla en suspensión, actúa como filtro de los rayos solares afectando la productividad primaria, y, por consiguiente la actividad fotosintética del fitoplancton, y la producción de oxígeno. La turbidez limita la habilidad de las especies para capturar el alimento y por consiguiente, éste irá al fondo del estanque acumulando materia orgánica, que consume oxígeno para su descomposición. (Welch, 1952).

El método clásico para monitorear la Turbidez en acuicultura es el Disco de Secchi, que permite determinar el nivel a través de la escala del disco que por inmersión en el agua, es visible en función de la concentración. Los niveles óptimos oscilan entre 20 a 60 cm, por lo que niveles inferiores a 20 cm demandan sistemas muy turbios con problemas en la concentración de oxígeno disuelto afectando a la productibilidad. Concentraciones entre 25 - 30 cm refleja Turbidez excesiva del medio. Entre 30 y 45 la Turbidez es aceptable con presencia de fitoplancton. Entre 45-60 cm el Fitoplancton se vuelve escaso y en casos de mayor concentración el agua es demasiada clara, con perjuicio a la producción al desarrollar medios acuáticos favorables para el crecimiento de plantas acuáticas.

## **3. Potencial de Hidrogeno (pH)**

El Potencial Hidrogeno o pH, se lo define como la concentración del ion hidrógeno e indica si el agua es de naturaleza ácida o básica, expresada en una escala que varía entre 0 y 14. Los cambios de pH dentro de un mismo cuerpo de agua están relacionados con la concentración de dióxido de

carbono, el cual es fuertemente ácido. Los organismos vegetales demandan CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis, de tal forma que este proceso determina en parte la fluctuación de pH y es así como se eleva durante el día y disminuye en la noche. La estabilidad del pH viene dada por la llamada reserva alcalina o sistema de equilibrio tampón, que corresponde a la concentración de carbonatos o bicarbonatos. Los extremos letales de pH para la población de peces y crustáceos en condiciones de cultivo, fluctúan entre 4 y 11. (Cachafeiro, 1984).

Los niveles del pH, menores a 4 son extremadamente ácidos con alto grado letal; entre 4 a 5 de pH, se presenta un bajo nivel de reproducción, de 4 a 6 el crecimiento es lento. Entre pH de 6 a 9 el desarrollo del crustáceo es óptimo, pero decrece a medida que medio se alcaliniza hasta llegar a 11, donde se convierte en letal.

#### **4. *Oxígeno Disuelto (OD)***

El Oxígeno disuelto constituye en las aguas acuícolas uno de los parámetros químicos de mayor importancia en cuanto se refiere a la calidad química del agua considerándose niveles óptimos entre 5 a 15mg/L. El déficit de OD, en concentraciones menores a 2 mg/L, y con exposición mayor a dos horas son letales. Entre 2 a 5 mg/L, el crecimiento es lento, alcanzando mayor rendimiento de productividad por su incidencia en la conversión alimentaria entre 5 a 10 mg/L. Niveles mayores originan inconvenientes por sobresaturación, pero cuando la dispersión es homogénea en el estanque no existen mayores problemas.

Es importante en acuicultura tener presente lo siguiente:

- a) El OD, se presenta en el agua por difusión desde el medio atmosférico, y por fotosíntesis, es consumido por la respiración de las especies bioacuáticas, que representa el proceso inverso a la fotosíntesis;

- b) Durante el día con la fotosíntesis se genera oxígeno que es removido del agua por la demanda respiratoria de las especies. En la noche, no hay aporte de oxígeno, por lo que los niveles en los estanques de producción son críticos en horas de la madrugada;
- c) La concentración de OD en los estanque varia por la iluminación solar; su ausencia imposibilita la fotosíntesis y por ende la producción de oxígeno;
- d) A mayor temperatura del agua se acelera el proceso de degradación de la materia orgánica y por consiguiente mayor consumo de oxígeno;
- e) El fitoplancton libera oxígeno durante el día y lo consume por las noches. El fitoplancton inerte de la superficie entra en descomposición biológica con consumo de oxígeno. El zooplancton y otros organismos consumen oxígeno durante el día y la noche;
- f) La materia orgánica y las comunidades bacterianas consumen oxígeno entre la capa superficial y la columna de agua; y,
- g) Las fluctuaciones OD en un estanque durante el día están sujeto a los niveles mínimos en horas de la madrugada, máximos en las primeras horas de la tarde que disminuye con el ocaso.

#### **2.3.4.2. *Parámetros nitrogenados que afectan la calidad.***

Los compuestos nitrogenados son producidos por fuentes naturales, como la actividad microbiana del agua y el suelo, la degradación y oxidación de la materia orgánica, reacciones de ionización provenientes de ciclos biogeoquímicos relacionado con el medio acuícola. Los ciclos a los que se hacen referencia generalmente se inician con la mineralización de los compuestos orgánicos degradados por acción enzimática de microorganismos heterótrofos, que originan amoníaco, nitritos y nitratos.

#### **1. *Nitrógeno amoniacal total (NAT)***

Representa la forma molecular del amoníaco ( $\text{NH}_3 - \text{N}$ ) que es degradado por bacterias del género *Nitrosomonas*, mientras que ( $\text{NH}_4 + \text{N}$ ) representa su forma ionizada obtenida por acción de bacterias del género *Nitrobacter*. El

amonio es uno de los parámetros nitrogenados de mayor atención en la producción acuícola, inicialmente es oxidado a nitritos, y luego a nitratos. Es por ello que la cantidad y calidad de alimento de suministro es en extremo importante para mantener el ciclo de nitrógeno bajo control (Schmidt et al., 1998). El amonio está expresado como Nitrógeno amoniacal total en ppm o mg/L ( $\text{NH}_3$ ), químicamente para su oxidación debe considerarse el comportamiento periódico del pH, temperatura y salinidad. (Crespi, 2008). El amoníaco es un compuesto que en concentraciones superiores a 0.45 mg/L, causan deterioro en peces y crustáceos, lesionando histológicamente las branquias y otros órganos, que estimula el crecimiento lento, (Boyd, 1990).

## **2. Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )**

Se presenta como la forma ionizada del ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), expresado en ppm o mg/L de  $\text{NO}_2^-$ ; se lo considera como un compuesto intermediario del proceso de nitrificación, donde el amonio es oxidado microbiológicamente a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), en estanques de producción acuícola. Los nitritos son considerados compuestos tóxicos por su facilidad de absorción a nivel intestinal y al sistema portal uniéndose al grupo HEM, de la hemoglobina interfiriendo la capacidad de transportar el oxígeno en la sangre. Niveles mayores de nitritos a 2 ppm son altamente tóxicos y letales para camarones y diversos tipos de peces. (Spotte, 1970, Boyd, 1979).

## **3. Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )**

Constituye el producto final de la oxidación del amonio expresado en ppm o mg/L de ( $\text{NO}_3^-$ ), su transformación comprende la oxidación del amonio a nitrito por acción de las bacterias **Nitrosomonas**, en condiciones aeróbicas tomando el nombre de nitrificación, mientras que la reducción del nitrito en nitrato por acción de bacterias **Nitrobacter**, se conoce como **desnitrificación**, cuyo mecanismo es anaeróbico. (Wheaton 1998, Vinatea 2001).

### 2.3.5. Estándares de Calidad de Agua Acuícola

Se definen como Estándares de Calidad de Aguas Acuícolas (ECAA), al establecimiento de Normas Internacionales con la finalidad de regular en cada país, requerimientos mínimos y máximos para cada uno de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, capaz de garantizar la calidad del agua en los diversos niveles de producción acuícola, sin que representen riesgos para la salud pública del hombre, las especies acuícolas y el medio ambiente. (Minan, 2009).

**Tabla 1.** Valores admisibles de la calidad del agua acuícola para parámetros nitrogenados tóxicos en estanque de cultivo de camarón blanco (C. Boyd).

Parámetros	Forma de expresar	Rangos admisibles
Temperatura	°C	18 - 25
Turbidez	cm-disco Sc	25 - 60
pH	Ácido/base	7 - 9
Oxígeno disuelto	mg/L O <sub>2</sub>	5 - 15
Nitrógeno Amoniacal Total	mg/L N-NH <sub>3</sub>	< 0.1 mg/L
Nitrógeno de Nitritos	mg/L N-NO <sub>2</sub>	< 0.23 mg/L
Nitrógeno de Nitratos	mg/L N-N <sub>3</sub>	0.2 - 10 mg/L

**Fuente:** Extracto tomado de las consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón (C. Boyd).

### 2.3.6. Características del ecosistema del mangle rojo

Científicamente conocida como *Rhizophora mangle*, es una especie que pertenece a la familia Rhizophoraceae, propio de ecosistemas marino-costeros, en trópicos y subtropical del planeta. En América Latina

ampliamente distribuido a las condiciones del medio desde México hasta el Ecuador. (*Rhizophora mangle* - Smithsonian Marine Station).

Los árboles de *Rhizophora mangle* pueden alcanzar entre 4 a 10 metros de altura con características de arbustos halófilo, apoyado de numerosas raíces de aéreas simples o ramificadas con numerosas lenticelas, la corteza es de color olivo pálido con manchas grises, sin embargo en el interior es de color rojizo, su textura es de lisa a levemente rugosa con apariencia fibrosa. Las hojas son simples, opuestas, pecioladas, de hoja redondeada, elípticas a oblongas, estas se aglomeran en las puntas de las ramas, su color es verde oscuro en el haz y amarillentas en el envés. Las flores son pequeñas, de 2.5 cm de diámetro con cuatro sépalos lanceados, gruesos y coriáceos.

El mangle rojo se adapta al ecosistema de aguas saladas y salobres, que les permite sobrevivir aun cuando sus órganos quedan bajo el agua. Entre estas adaptaciones destacan aquellas encaminadas a evitar la anoxia o falta de oxígeno de los órganos sumergidos y aquellas que favorecen la eliminación de las sales. En el ámbito acuícola la corteza del mangle rojo actúa de manera eficaz en la inhibición de microorganismos patógenos como el estafilococo dorado, entre otros.

El ecosistema del mangle origina una microbiota ampliamente distribuida en la naturaleza, debido a su capacidad de adaptación, localizándose frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, como carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas (Rojas y Vargas, 2008).

### ***2.3.7. Microbiota natural en los organismos acuícolas***

La microbiota de especies acuáticas no existe como una entidad absoluta, se presenta como un sistema interactivo constante entre el ambiente y los

organismos bioacuático, de tal forma que crustáceos y microorganismos comparten el mismo ecosistema (Al- Harbi y Uddin, 2005).

Desde este ámbito, la microbiota está determinada por su contacto con el medio ambiente circundante, e influenciada por la ingesta de alimento, secreción de hormonas y absorción de nutrientes, así como la presencia de proteínas y enzimas digestivas. Inicialmente, cepas anaeróbicas facultativas dominan el intestino y posteriormente la variabilidad poblacional dependerá del tipo de dieta ingerida, la edad, la ubicación geográfica, tratamientos diversos, y el estado general del organismo (Cahill, 1990; Isolauri y col., 2001).

Metabólicamente la microbiota acuícola tiene funciones en los procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo. La microbiota estimula la actividad trófica fomentando el crecimiento y la diferenciación celular, estimula el sistema inmune del organismo. Mantiene funciones protectoras que se desarrolla desde el inicio de su actividad biológica, ya que actúa como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos exógenos u oportunistas, creando el efecto de bioseguridad como barreras biológicas.

El principio de la utilización de barreras biológicas creadas por la microbiota, permite desarrollar estrategias para obtener una producción acuícola de calidad, para lo cual la utilización de bacterias antagónicas de microorganismos patógenos en sistemas de cultivo intensivo o semi-intensivo, ha sido ampliamente desarrollada específicamente en el uso de probióticos. Diversos estudios revelan que los probióticos se presentan como alternativa potencial para implementar sistema de producción sostenible y efectiva, tanto como promotores del crecimiento, o como protectores frente a enfermedades infecciosas. En general, a nivel experimental existen comercialmente diversas cepas con esta facultad que son utilizadas como herramientas útiles para mejorar la producción y el estado de salud de especies acuícolas. (Watson y col., 2008; Dimitroglou y col., 2011).



### **2.3.8. Fundamentos de Metagenómica**

Metagenómica es el estudio de material genético recuperado directamente del medio ambiente en un ecosistema determinado, por consiguiente presenta un amplio campo de aplicación e investigación, por lo que también se la conoce como Genómica Ambiental, Ecogenómica o Genómica de la Comunidad. (Wikipedia.org. 2016).

Kevin Chen y Lior Pachter, definen la Metagenómica como “la aplicación de técnicas genómicas modernas para el estudio directo de comunidades de microorganismos en su entorno natural, evitando la necesidad de aislar y cultivar cada una de las especies que componen la comunidad”. El término metagenoma hace referencia a la idea de que un conjunto de genes secuenciado del ambiente que son analizados de una manera análoga a la del estudio de un solo genoma. (Jo Handelsman; Jon Clardy; Robert M. Goodman. 1998).

La aplicación de la metagenómica molecular en la práctica ambiental permitió utilizar la técnica de la Reacción en Cadena de Polimerasa (**“Polymerase Chain Reaction”. PCR**), para explorar ampliamente la diversidad secuencial de ARN ribosomal, por lo que se propone clonar el ADN, de las comunidades microbianas directamente del medio ambiente. (Pace Norman; 1991. Schwieger y Christoph. 1998).

En estas últimas dos décadas se han intensificado investigaciones de muestras medio ambientales a través de técnicas moleculares con el objetivo de desarrollar secuencias de ADN ribosómico de cultivos de bacterias oxidantes del amonio específicamente de sedimentos húmedos donde se han secuenciado bacterias nitrificantes y no nitrificantes. (Aakra et al, 2001).

La secuenciación del ADN, por técnicas moleculares es posible compararlas secuencialmente, con la base de datos del “National Center for

Biotechnology Information" (NCBI). Para ello puede emplearse la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico ("basic local-alignment search tool"). Consecuentemente la metagenómica aplicada es una técnica molecular moderna que permite identificar miles de bacterias de un hábitat común, sin tener que aislarlas mediante cultivos axénicos. (Frias-Lopez et al, 2008; Fuhrman y Steele, 2008; Schloss y Handelsman, 2008; Follows y Dutkiewicz, 2011; Somboonna et al, 2012).

Además la metagenómica ambiental permite comprender cómo actúan las comunidades microbianas frente a los contaminantes tóxicos nitrogenados, evaluar el potencial de los sitios contaminados para su recuperación aplicando técnicas modificadas de biorremediación con bioaumentación o bioestimulación. (George I (2010).

La metagenómica se basa en la experiencia de muchas disciplinas que incluye la microbiología, la genética microbiana, bioquímica, fisiología, patología, sistemática, ecología, estadísticas, bioinformática, y evolución de las ciencias ambientales que se relacionan con organismos hospedadores, tales como los seres humanos y otros mamíferos, plantas, insectos, así como huéspedes microbianos con un papel importante en la naturaleza, considerándose que esta ciencia es mucho más que las secuencias de ADN, como lo plantea la Academia Nacional para la Investigación Metagenómica. (Panorama institucional para Metagenomics: Nueva Ciencia, nuevos desafíos." Consejo nacional de investigación. La nueva ciencia de la metagenómica: Revelando los secretos de nuestro planeta microbiano. Washington, DC: The National Academies Press, 2007. doi: 10.17226 / 11902.

#### **2.3.8.1. Metagenómica de Escopeta (ESS).**

Los avances en la bioinformática, el perfeccionamiento de técnicas de amplificación de ADN, y la estrategia computacional han permitido construir el análisis de secuencias de ADN recuperados de muestras del medio ambiente, lo que permite la adaptación de la técnica de secuenciación

escopeta a muestras de metagenómica (Shotgun Sequencing Environment – ESS). La información de esta técnica metagenómica de escopeta de medio ambientales revela la secuenciación de una diversidad de genes presentes en las muestras, proporcionando información acerca de qué organismos están presentes y qué procesos metabólicos son posibles en la comunidad. (Edwards, RA; Rodriguez-Brito B; Wegley L; Haynes M; Breitbart M; Peterson DM; Saar MO; Alexander S; Rohwer F (2006).

La diversidad microbiana del medio ambiente y la naturaleza contaminantes de los mismos, dificulta la recolección de ADN, a partir de un ambiente que por lo general no tiene un control adecuado, por lo que los organismos más abundantes en una muestra ambiental, tienen mayor representación en los datos resultantes de la secuencia. La práctica de la genómica ambiental sugiere muestreos aleatorios representativos, de tal forma que se dé cobertura necesaria a los miembros de la comunidad, que por esta técnica pueden estar representados en segmentos de pequeña secuencia, al contrario de los del uso de cultivos tradicionales que circunstancialmente pasan desapercibidos con esta metodología. (Nicola, Segata; Daniela Boernigen; Timothy L Tickle; Xochitl C Morgan; Wendy S Garrett; Curtis Huttenhower (2013); Tyson, GW; Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF (2004).

La secuenciación de escopeta de las muestras medio ambientales sigue un protocolo que consta de las siguientes fases:

- a.** Toma de muestras del hábitat;
- b.** Filtración de partículas por tamaño;
- c.** Lisis y extracción de ADN;
- d.** Clonación y construcción de la biblioteca;
- e.** Secuenciación de los clones; y,
- f.** Ensamble de secuencias en escaleras y andamios.

### **2.3.8.2.      *Secuenciación de alto rendimiento.***

La secuenciación de alto rendimiento es una de las técnicas moleculares muy utilizada en estudios metagenómicos ambientales de acuerdo a la naturaleza y características de las muestras donde se utiliza paralelamente 454 pyrosecuenciaciones, basada en la fragmentación más en relación a los que se utiliza en la secuenciación de Sanger.

Otras técnicas como la de Ion Torrent Personal Genome Machine, Illumina MiSeq OHiSeq y Applied Biosystems SOLID, difieren por las fragmentaciones que del ADN, que son unas más cortas de otras en relación a los fragmentos de Sanger. Esta limitación del fragmento es compensada por el mayor número de lecturas que presentan secuenciaciones extensas. La ventaja adicional para la secuenciación de alto rendimiento es que esta técnica no requiere clonar el ADN antes de secuenciar, evitando uno de los procesos más largos y complicados del muestreo ambiental. (Poinar, HN; Schwarz, C; Qi, J; Shapiro, B; Macphee, RD; Buigues, B; Tikhonov, A; Huson, D; Tomsho, LP; Auch, A; Rampp, M; Miller, W; Schuster, SC 2006).

## CAPÍTULO 3: METODOLOGIA

### 3.1. Tipo y diseño de la investigación

#### *3.1.1. Tipo de investigación*

Kerlinger F. (2002), conforme los postulados en su libro Investigación del Comportamiento, el tipo de esta investigación es cuasi experimental, por manipulación de la variable independiente (**Microbiota autóctona del mangle rojo**). La microbiota autóctona es manipulada y sometida a un proceso de enriquecimiento por bioaumentación con melaza, obteniéndose un consorcio microbiano que constituye la variable dependiente (**Microbiota bioaumentada**). La microbiota bioaumentada utilizada en la descontaminación del agua, está relacionada con el efecto biorremediador que da lugar a la segunda variable dependiente (**Biorremediación**).

#### *3.1.2. Diseño experimental*

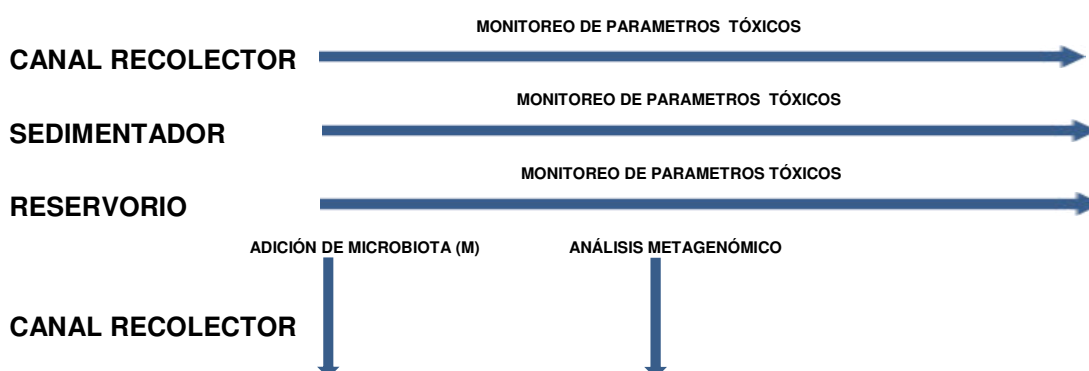
El diseño cuasi experimental que se aplica según Campbell y Stanley (1996), corresponde al de series cronológicas que en este caso se realiza en dos fases:

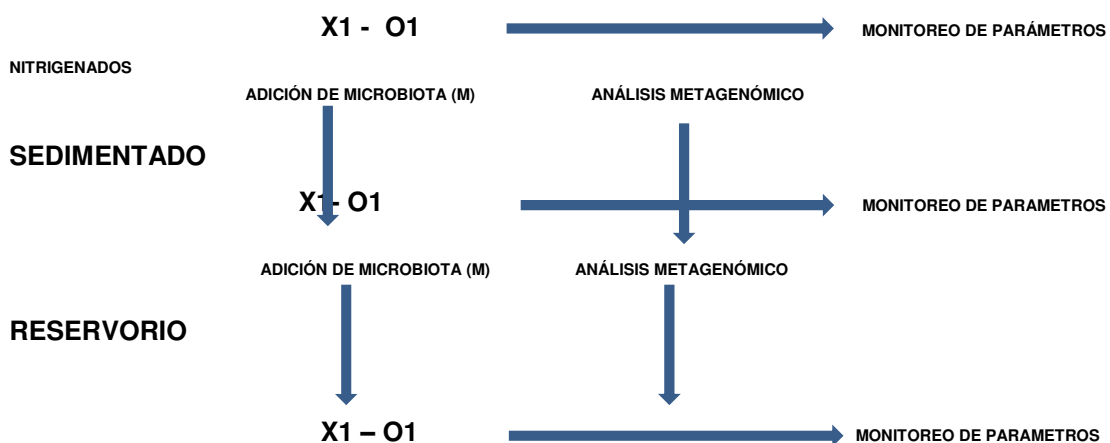
La primera fase corresponde al diagnóstico de la calidad del agua recirculante en el canal de recolección, sedimentador y reservorio, donde se monitorea los parámetros tóxicos. Con este diagnóstico se define la estrategia de biorremediación con la microbiota bioaumentada por un lapso de dos semanas con la finalidad de estimular el aumento de la concentración del Oxígeno Disuelto y disminuir los niveles del Amonio, Nitritos y Nitratos, a rangos aceptables antes de ser recirculada el agua a la piscina de experimentación. Paralelamente se realiza la caracterización de la microbiota bioaumentada del sedimento y cuerpo de agua en los 3 estanques.

La segunda fase continua con el proceso de biorremediación en la piscina de experimentación, en la llamada semana cero donde el agua que proviene del reservorio es sometida a un proceso de estabilización de los parámetros básicos y tóxicos, incluyendo el OD. La siembra de la semilla prejuvenil del camarón tiene lugar en la primera semana y por consiguiente el inicio de la nutrición controlada en función de la densidad de la siembra. El monitoreo de parámetros fisicoquímicos y tóxicos en esta instancia es constante, así como su evaluación que permite definir la estrategia de aplicación de la microbiota. Paralelamente se realiza muestreos para la caracterización de la microbiota utilizada con la finalidad de verificar su comportamiento y evaluar su actividad biorremediadora en las diferentes instancias de la producción.

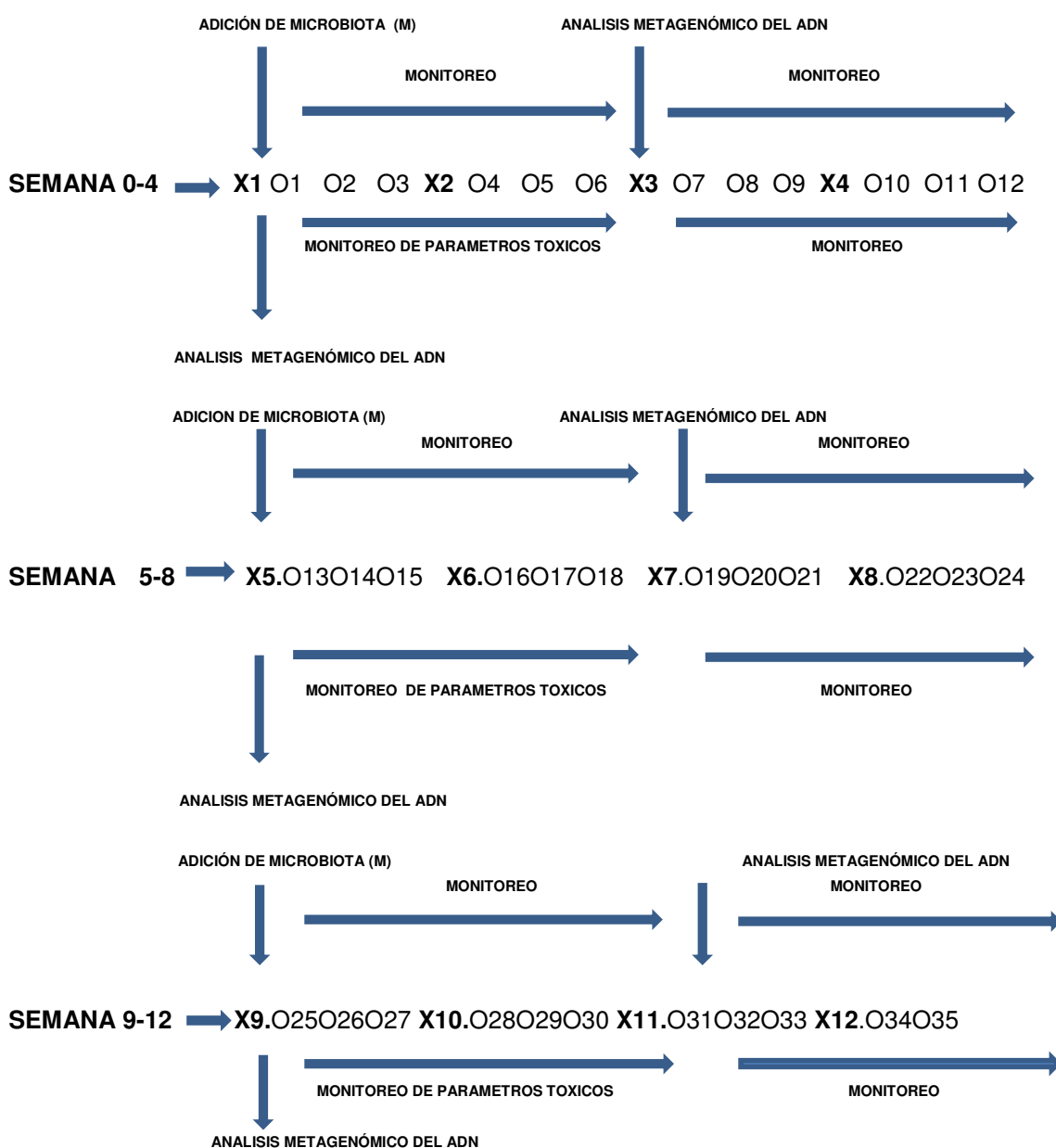
## DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

### PRIMERA FASE: PREVIA A LA SIEMBRA (De una a dos semanas)





### SEGUNDA FASE: PISCINA DE EXPERIMENTACIÓN (12 SEMANAS)



**Donde.**

M = Muestra de microbiota utilizada en la biorremediación

O = Observación, determinación y evaluación de parámetros nitrogenados  
(Muestreo 01.....35)

X= Aplicación de microbiota bioaumentada (X1.....X12)

**3.2. Hipótesis****3.2.1. Hipótesis General**

La microbiota autóctona del mangle rojo estimula la biorremediación del agua favoreciendo la degradación y oxidación de la materia orgánica, manteniendo la calidad del agua en condiciones óptimas para el cultivo del camarón blanco.

**3.2.2. Hipótesis Específicas****Hipótesis específica 1**

La cuantificación de los parámetros tóxicos permite evaluar la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco.

**Hipótesis específica 2**

La bioaumentación de la microbiota autóctona del mangle rojo actúa en la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco.



### **Hipótesis específica 3**

La diversidad de la microbiota del mangle rojo influye en la biorremediación del agua en el cultivo de camarón blanco.

### **3.3. Variables**

La variable independiente (**X**) en esta investigación es la microbiota autóctona extraída del ecosistema del mangle rojo de la zona de la desembocadura del río Chaguana, en el Cantón el Guabo, Provincia de El Oro, república del Ecuador.

La variable dependiente 1, la constituye la microbiota bioaumentada que resulta de la manipulación de la variable dependiente sometida a un proceso de bioaumentación con sustancias energéticas.

La variable dependiente 2, corresponde a la Biorremediación del agua que es el efecto de la actividad metabólica de la biodiversidad microbiana contenida en la microbiota bioaumentada, al interactuar con los residuos orgánicos originados del metabolismo de los nutrientes asimilados por el camarón que genera productos tóxicos que afectan la calidad del agua y por ende la salud del crustáceo, la producción y contaminan el ecosistema.

#### **3.3.1. Variable Independiente X**

Microbiota autóctona del mangle rojo

##### **3.3.1.1. Dimensiones.**

Biodiversidad de especies microbianas

**3.3.1.2.      *Indicadores.***

Biodiversidad bacteriana

**3.3.2. *Variable Dependiente 1***

Microbiota autóctona bioaumentada

**3.3.2.1.      *Dimensiones.***

Biodiversidad bacteriana

**3.3.2.2.      *Indicadores.***

Microbiota bioaumentada

**3.3.3. *Variable Dependiente 2***

Biorremediación del agua

**3.3.3.1.      *Dimensiones.***

Descontaminación del agua

**3.3.3.2.      *Indicadores.***

Amonio

Nitritos

Nitratos

Oxígeno disuelto.

### 3.4. Operacionalización de variables

La Operacionalización de variables se realiza a partir de una fase previa que comprende la manipulación de la variable independiente (microbiota autoctona) y en tres instancias consecutivas que se desarrollan en un periodo de 14 semanas, cuyo objeto es garantizar la calidad del agua recirculante antes y después de la siembra del camarón blanco, manipulando la variable independiente (X).

La fase previa constituye la manipulación de la microbiota autóctona extraída del mangle rojo con la finalidad de obtener un producto libre de contaminantes y tratado a nivel de laboratorio, capaz de lograr la mayor biodiversidad microbiana, así como la concentración adecuada para su bioaumentación.

La primera fase de la Operacionalización comprende la adición de la microbiota bioaumentada (Variable dependiente 1), en un volumen y concentración determinada técnicamente, en función de la cuantificación de los parámetros tóxicos y el oxígeno disuelto, en el estanque de recolección de aguas con una interacción de 48 a 72 horas. Las características metagenómicas de esta variable presumiblemente se modifican en cuando a su biodiversidad por efectos de la bioaumentación y la interacción con la microbiota propia del medio acuícola, aunque su dimensión e indicadores se mantienen. Se complementa la Operacionalización en esta fase con la cuantificación de los parámetros tóxicos, que permite evaluar la actividad biorremediadora de la microbiota bioaumentada con lo cual los niveles de toxicidad tienden a disminuir considerablemente con evidente aumento del oxígeno disuelto.

La segunda fase de la biorremediación se desarrolla en el estanque de sedimentación, de forma similar a la anterior, con características similares

que favorece la disminución de la concentración de parámetros tóxicos, cuyo tiempo de interacción es de 48 a 72 horas.

La tercera fase se realiza en el reservorio donde la microbiota bioaumentada completa su actividad biorremediadora, estabilizando los parámetros básicos y manteniendo los tóxicos en niveles óptimos para la siembra del camarón blanco. El tiempo de interacción en esta fase es similar a los casos anteriores con la garantía de la calidad óptima del agua.

Se completa la Operacionalización de variables en la piscina de experimentación donde se recircula el agua tratada con la microbiota bioaumentada y se realiza la siembra del camarón blanco. El periodo de adición de la microbiota bioaumentada es de cada 48 o 72 horas, dependiendo del comportamiento de los tóxicos. La duración de este proceso es de 12 semanas, tiempo en que la biorremediación debe cumplirse en función de las técnicas establecidas, garantizando al final su producción y la salud animal libre de agentes patógenos.

### **3.5. Unidad de análisis**

La microbiota autóctona del mangle rojo se obtiene del ecosistema del río Chaguana, Cantón El Guabo-Provincia de El Oro, comprendida en las coordenadas, 03°05'46.98" S y 79°51'18.54" O. El procesamiento del material extraído autóctona del mangle rojo, se procesa en el Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Agropecuaria de la Universidad Técnica de Machala. La bioaumentación de la microbiota constituye un proceso importante que permite hasta obtener la concentración y calidad requerida.

La biorremediación se realiza en la unidad productiva acuícola de experimentación de la Empresa CAMARCIELO, ubicada en la parroquia Chacras del Cantón Arenillas, en las coordenadas 03°32'42.72" S y 80°12'02.28" O, en la zona fronteriza entre Perú-Ecuador.

La microbiota bioaumentada a utilizarse en la biorremediación del agua, es enriquecida en la unidad de producción por fermentación de carbohidratos y aminoácidos en la unidad productiva, en el volumen estimado en función la densidad de la siembra, el volumen de la unidad de producción experimental y el monitoreo de la calidad del agua durante las 12 semanas del periodo de producción del camarón.

El período de aplicación de la microbiota bioaumentada varía en función de la evolución del producto y el monitoreo de la calidad del agua. A partir de la siembra de la semilla prejuvenil la aplicación de la microbiota es a las 72 horas y a partir de esa instancia cada 8 días. El monitoreo para evaluar los efectos de la biorremediación se ejecuta in situ cada 48 horas utilizando equipo multiparametro que permite obtener lecturas espectrofotométricas de los parámetros definidos desde el primer día de la siembra.

El análisis metagenómico de la microbiota autóctona extraída del mangle rojo, la microbiota procesada en el laboratorio y la bioaumentada obtenida en la unidad de producción se procesó en el Instituto de Capacitaciones de Biotecnología (INCA BIOTEC), en la provincia de Tumbes - República del Perú, donde se extrae el ADN y se replica utilizando la técnica de PCR.

La secuenciación del ADN extraído del material metagenómico se realizó a través del intercambio científico entre INCA-BIOTEC y la Empresa Alemana StarSEQ con sede en Mainnz-Alemania, utilizando la técnica Illumina Mi Seq, generadas a través del software QIIME versión 1.9.1 (Caporaso, 2011).

### 3.6. Población en estudio

La población en estudio la constituye la microbiota bioaumentada, a través de la biodiversidad microbiana que ejerce la actividad biorremediadora en el agua. Previamente se obtuvo una muestra madre del material extraído del mangle rojo con la finalidad de conocer su biodiversidad. En la fase experimental se obtuvieron muestras de sedimento y del agua del estanque de recolección del agua, sedimentador, reservorio y piscina de producción, a las cuales se aplicó el estudio metagenómico. En la última semana de producción se obtuvo muestras del producto previo la cosecha con la finalidad de establecer la diversidad microbiana del camarón. El comportamiento de la calidad del agua por efectos de la biorremediación se evaluó a través del monitoreo de los parámetros tóxicos y del oxígeno disuelto.

### 3.7. Tamaño de la muestra

El muestreo será del tipo aleatorio simple de acuerdo a lo enunciado por Williams (1978), citado en el la obra de Fred Kerlinger “Investigación del Comportamiento”, donde se hace referencia al muestreo aleatorio simple cuando se trata de una población finita de tamaño N, donde el muestreo se realiza sin reemplazamiento, sugiere un ajuste a la formula inicial considerando n como un valor estimado a utilizarse acorde a la visión del investigador:  $n' = n / 1 + n / N$

**Dónde:**

$n'$  es el tamaño estimado de la muestra;

$n$  el tamaño de la muestra utilizada en la formula inicial modificada; y,

$N$  el tamaño de la población.

De acuerdo a esta sugerencia el tamaño de la muestra es:

$$n' = 84 / 1 + n / N$$

$$n' = 84 / 1 + 84 / 50.000$$

$$n' = 84 / 1 + 0,00168$$

$$n' = 84 / 1 + 2,00168$$

$$n' = 41,9$$

$$n' = 42$$

**3.8. Selección de la muestra**

La muestra de la microbiota en estudio es seleccionada de acuerdo a la interpretación de investigaciones direccionadas al aprovechamiento de la potencial actividad biorremediadora de determinadas especies microbianas, propias de los ecosistema donde confluyen aguas marítimas y aguas dulces, así como la microflora originaria por actividades biológicas de la fauna silvestre propias de estos sectores, así como de resultados previos obtenidos en el Laboratorio a pequeña escala. El área seleccionada para el muestreo de la microbiota autóctona permite acceso rápido por vía fluvial y un ambiente apropiado en la desembocadura del rio en las costas del pacifico a 60 minutos del Centro de Investigaciones y de la Unidad Productiva. Para la captación in situ de la microbiota autóctona se aplica protocolo previamente establecido, que incluye barreras de protección

personal, objetos de acero inoxidable para la toma de muestra, procurando que sean lo más representativa posible considerando la capa superficial del sedimento, así como las raíces y zonas bentónicas del mangle rojo. El material obtenido se coloca en recipientes plásticos de tapa ancha roscable de 500 ml de capacidad, se rotula y se coloca en dispositivos refrigerados que contienen hielo triturado para mantener la temperatura por debajo de 8°C, hasta ser transportada al laboratorio.

Las muestras recolectadas son procesadas de acuerdo a los protocolos establecidos para obtener una muestra madre, y a partir de esta un consorcio bacteriano que es sometido a un periodo de incubación de ocho días en condiciones anaerobias.

La bioaumentación se origina por degradación metabólica microbiana de materia hidrocarbonada que actúa como fuente energética, donde su componente básico es la glucosa que ingresa a los ciclos bioquímicos bioenergéticos para liberar energía química, en forma de ATP. Por otro lado los nutrientes utilizados en la alimentación acuícola aportan aminoácidos que estimulan el crecimiento y desarrollo de la producción acuícola.

### **3.9. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos**

Sampiere Hernández (2010), sugiere el diseño de un plan de recolección de datos en función del problema en estudio, hipótesis y variables, que permitan armonizar los objetivos y comprobar la hipótesis la investigación.

La recolección de datos se basa en la evaluación primaria a través de observaciones in situ relacionado a factores medioambientales que pueden actuar como factores de riesgos negativos. La información obtenida en la



aplicación, manipulación y efecto de la microbiota permite definir la **variable independiente** (Microbiota autoctona). A partir de este proceso primario se obtiene la **variable dependiente 1** (Microbiota bioaumentada).

El estudio metagenómico de las muestras analizadas que constituyen la variable independiente y la dependiente respectivamente, permite conocer la biodiversidad microbiana de la microbiota utilizada en la biorremediación del agua. Las técnicas de extracción, replicación y comprobación del ADN, aplicando el método de PCR. La secuenciación del ADN permite obtener conocer la biodiversidad de la microbiota que interactúa en la biorremediación del agua. La información secuencial se obtiene con la técnica ILLUMINA, a través del Software Qiime versión 1.9.1, que permite conocer con un elevado grado de confiabilidad del 99,9%.

La recolección de datos en el proceso de biorremediación que constituye la **variable dependiente 2**, se realizará a través del monitoreo de los parámetros tóxicos, obtenidos in situ a través de equipos de campo multiparametro. La recolección de datos se evidencia a través de una matriz donde se registra toda la información de los indicadores que permite interpretar el comportamiento de las variables y comprobar la hipótesis.

Los instrumentos de la investigación son sometidos a juicios de expertos que con pleno conocimiento de la temática en función de la matriz de consistencia expondrán sus puntos de vista de los datos obtenidos, previo la discusión de los mismos.

### **3.10. Análisis e interpretación de la información**

#### **3.10.1. Clasificación, registro y codificación de datos**

En general los datos obtenidos de la investigación serán procesados secuencialmente a través del Programa Computacional Microsoft Excel Office, para obtener datos estadísticos de centralización, construir histogramas, ploteo de datos que permitan analizar los resultados obtenidos. Estadísticamente se utilizara de ser necesario el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) con la finalidad de demostrar la contratación de la hipótesis en función de los objetivos planteados.

### **3.10.2. Métodos y Técnicas Analíticas**

#### **3.10.2.1. Procesamiento de la microbiota.**

La microbiota autóctona extraída del mangle rojo es procesada en el laboratorio a través de la bioaumentación con melaza conforme los protocolos establecidos para obtener el consorcio microbiano en una concentración de v/v, que constituye la microbiota bioaumentada utilizada en la biorremediación. Esta microbiota bioaumentada previo a su utilización es enriquecida con melaza y aminoácidos por fermentación durante de 8 días.

#### **3.10.2.2. Técnica de Biorremediación del agua recirculante.**

El proceso de biorremediación del agua recirculante se aplica previamente en el recolector de agua, sedimentador y reservorio, de acuerdo al siguiente protocolo.

1. Se monitorea los parámetros básicos y tóxicos para determinar la calidad del agua recirculante en el recolector de aguas donde se desarrolla la parte de la degradación orgánica.
2. Se adiciona la microbiota bioaumentada en un volumen técnicamente establecido conforme el monitoreo de los parámetros de tal forma que interactúen en el medio acuático al menos 72 horas.

3. En el sedimentador donde se desarrolla la oxidación total de la materia orgánica se monitorea el comportamiento de los parámetros tóxicos en el agua y se toman muestras del sedimento y del agua para el análisis metagenómico. Se aplica la microbiota bioaumentada.
4. Igual tratamiento se aplica en el reservorio hasta obtener una calidad de agua óptima con la estabilización de los parámetros básicos y tóxicos al menos por 72 horas.

#### **3.10.2.3. Biorremediación en la piscina de producción.**

Una vez que el agua recirculante estabiliza sus niveles de compuestos básicos y tóxicos, se transfiere el agua del reservorio a la piscina de producción iniciándose la denomina semana cero y se continúa de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se monitorea los parámetros básicos y tóxicos previos la adición de la microbiota bioaumentada que interactúa con la microbiota natural por 72 horas.
2. Al tercer día de interacción se realiza la siembra de especies prejuvenil del camarón y se realiza el monitoreo de parámetros tóxicos de ser posible cada 24 horas, de acuerdo al comportamiento de los niveles de concentración. Paralelamente se muestrea el sedimento y el agua para el análisis metagenómico.
3. La microbiota se adiciona cada 8 días en condiciones normales de niveles de parámetros básicos y tóxicos. De existir alteración considerable se debe adicionar un nuevo volumen de microbiota bioaumentada.
4. Este proceso es cíclico durante las doce semanas que se estima para obtener el producto final. En la semana doce se toma muestras del camarón para la aplicación del análisis metagenómico que permite establecer la diversidad microbiana del crustáceo.

El monitoreo de la Temperatura, pH y Oxígeno Disuelto se realiza a través del equipo electrométrico multiparametro in situ. La Turbiedad se realiza con la técnica del disco de Secchi y los parámetros tóxicos como son el Amonio, Nitritos y Nitratos, se cuantifican en el equipo multiparametro de alta sensibilidad.

#### **3.10.2.4. *Metagenómica de la microbiota.***

Permite conocer a plenitud la biodiversidad microbiana aplicando técnicas de extracción, comprobación y secuenciación del ADN de la microbiota utilizada en la biorremediación del agua. Para la ejecución se sigue el siguiente protocolo:

##### **1. Homogenización del material recolectado.**

Aplicando la técnica Kit Power Soil ® DNA Isolation Kit de suelo marino, se realizó un POOL, para obtener muestras representativas de los diversos sitios de muestreo. La muestra homogenizada se rotula como “M”, de la cual se toma 0.25 mg para la extracción de ADN; y otro tipo de muestra denominada CO-CULTIVO, de la cual se centrifugo 12 ml a 10 000 rpm por 5 minutos. Del sedimento se toma con pipeta automática 400 µL codificándose como muestra “C”.

##### **2. Extracción de ADN.**

1. Agregar 0.25 gr de muestra en análisis en los tubos Power Bead.
2. Agitar la muestra hasta lograr su homogenización.
3. Agregar 60 µl de la solución C1 e invertir varias veces. Previamente debe verificarse que la solución C1, no este precipitada, de ser el caso calentar a 60°C para su disolución.
4. Vortexear vigorosamente por 10 minutos.
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 30 segundos.
6. Transferir el sobrenadante (entre 400-500ul) a los tubos de 2 ml Collection Tube.

7. Agregar 250 µl de la solución C2 y vortexear por 5 segundos.
8. Incubar a 4°C por 5 minutos.
9. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000xg por 1 minuto.
10. Transferir 600 µl del sobrenadante a los tubos de 2 ml Collection Tube tratando de no llevar restos del pellet.
11. Agregar 200 µl de la solución C3 y vortexear brevemente e Incubar a 4°C por 5 minutos.
12. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 1 minuto.
13. Recuperar (600-750 µl) del sobrenadante a los tubos de 2 ml Collection Tube tratando de no llevar restos del pellet.
14. Agite ligeramente la solución C4 antes de usar.
15. Agregar (960-1200 µl) de la solución C4 al sobrenadante y vortexear por 5 segundos.
16. Filtrar la mezcla dentro de los SPIN FILTER, cargando no más de 700 µl de la mezcla, centrifugar a temperatura ambiente a 10,000 rpm, por 1 minuto y eliminar el filtrado. Realizar el mismo proceso 2 veces hasta filtrar toda la mezcla.
17. Agregar 500 µl de la solución C5 al SPIN FILTER y centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000 rpm, por 30 segundos. Descartar el filtrado.
18. Centrifugar nuevamente los tubos a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 1 minuto. Descartar el filtrado.
19. Transferir el SPIN FILTER a un nuevo Collection Tube de 2ml y agregar 100 µl de la solución C6.
20. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 30 segundos. Descartar el SPIN FILTER y almacenar el DNA a - 20°C.

### **3. Comprobación de ADN por la técnica de PCR.**

Para la ejecución de esta técnica simple se requiere cada una de las muestras en concentración original y diluida al 1/5 con agua ultra pura y para lo cual se utiliza el protocolo establecido en el Kit Taq DNA Polymerase

Recombinante 5 U/  $\mu\text{L}$  –Thermo Scientific. El gen amplificar es el 16S rRNA (Bacterias) con un aproximado de 1500 pares de bases.

La técnica describe la preparación un mix en común en un tubo de 1.5 ml, la cual el número de reacciones se multiplica por las cantidades iniciales de los 7 primeros reactivos y luego se distribuye los 23  $\mu\text{L}$  a los microtubos de 0.2 ml. El número de reacciones se considera la suma de las muestras (ADN) + C.E (Control de Extracción) + C-PCR (Control Negativo de PCR) + Control Positivo. La técnica se ejecuta en bloque de hielo a través del siguiente protocolo.

<b>TÉCNICA PARA EXTRACCIÓN DEL ADN</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Inicial</b>	<b><math>\mu\text{L}</math> por reacción</b>	<b>Final</b>
Taq buffer	10X	2.5 $\mu\text{L}$	1X
dNTP's	10mM	0.5 $\mu\text{L}$	0.2 mM
$\text{Cl}_2\text{Mg}$	25 Mg	2 $\mu\text{L}$	2 mM
16SrRNA 27FC	15pmol/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.6 pMol/(0.6 $\mu\text{M}$ )
16SrRNA 1492 RC	15pmol/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.6pMol/ $\mu\text{L}$ (0.6 $\mu\text{M}$ )
16SrRNA 1492 RC	15pmol/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.6pMol/ $\mu\text{L}$ (0.6 $\mu\text{M}$ )
Water, nuclease	-	15.8 $\mu\text{L}$	
ADN	-	2 $\mu\text{L}$	
Volumen		Final 25 $\mu\text{L}$	

## PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

Períodos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Initial Desnaturation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	30segundos	35
Annealing	58°C	45segundos	
Extensión	72°C	1.½ min	
Final extensión	72°C	6min	1
Almacenar	4°C		

### 4. Electroforesis.

Nos permite comprobar la eficacia y calidad del ADN extraído, para lo cual se comprueba en un gel agarosa al 1,5 %, utilizando como diluyente TAE 1X (40mM Tris, 20mM Ácido Acético Glacial, 1mM EDTA), y bromuro de etilo 0.5 µg/ml. La migración de las bandas de ADN, se registra en la parte superior por acción electroforética presentando una coloración violeta.

La ejecución de la técnica se realiza adicionando la agarosa en el molde correspondiente cuando se encuentra entre 40 – 50°C, se adiciona bromuro de etilo y se homogeniza. Se mezcla 2 µL del tampón de depósito DNA Gel Loading Dye (6X) - Thermo Scientific, con 10 µL del producto amplificado y se deposita en los pocillos del gel que está sumergido con TAE 1X dentro de la cubeta electroforética. Se programa el termociclador a 90 voltios por 30 minutos en la fuente de poder. El marcador de peso molecular usado es Gene Ruler 1 kb DNA Ladder-Thermo Scientific.

### Leyenda:

Línea 01 muestra C concentrada.

Línea 02 muestra C diluida 1/5.

Línea 03 muestra M concentrada.

Línea 04 muestra M diluida 1/5

Línea 05 Control Negativo de PCR.

Línea 06 Control Positivo.

Línea 07 Marcador de Peso Molecular 1Kb

## 5. Secuenciación

La secuenciación del ADN, se realiza a través de la técnica secuencial 16S ILLUMINA, utilizando el Software QIIME versión 1.9.1 para su análisis e interpretación. (Caporaso, 2011). Para la aplicación de este proceso se filtraron las secuencias con puntajes de calidad  $\geq$  Q30 y longitud de la cadena de  $\geq$  200, y con el comando usearch61 se detectaron y filtraron las secuencias quimeras (Edgar *et al.*, 2011), Las secuencias no quimeras fueron asignadas en OTUs (unidades taxonómicas operacionales) con un 97% de identidad taxonómica a la base de datos SILVA v128 (<https://www.arb-silva.de/>), se utilizó para la identificación taxonómica de bacterias. Por último, se filtraron los OTUs menores a 0,005% (Bokulich *et al.*, 2013).

Los índices de alfa diversidad han sido calculados según la riqueza (Chao1) y la diversidad de especies (Shannon) en ambas muestras. Además, los índices de beta diversidad han sido utilizados para diferenciar la estructura de las comunidades bacterianas dichas muestras (venn, Heatmap) utilizando QIIME versión 1.9.1 y Rstudio (Wang *et al.*, 2007).



## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados**

En función del diseño metodológico y los datos obtenidos en las diferentes fases de la investigación se elaboró cuadros y gráficos estadísticos que permite analizar el comportamiento de los parámetros básicos y nitrogenados tóxicos, en las diferentes instancias de la investigación utilizando microbiota bioaumentada procedente del ecosistema del mangle rojo.

#### **4.1.1. *Monitoreo de parámetros fisicoquímicos previo a la biorremediación***

Corresponde al análisis de parámetros básicos y tóxicos del canal recolector de agua, sedimentador y reservorio, previo el tratamiento de biorremediación. En esta instancia se evidencia alto índice de turbidez que oscila entre 12.00 y 32.00 en referencia a la Escala del Disco de Secchi; la temperatura promedia 24°C, acelerando la degradación orgánica de compuestos tóxicos; el pH es variable con una concentración máxima de 8.3 en el reservorio. Los parámetros tóxicos en el canal de recolección de agua son extremadamente altos con tendencia a la baja por efectos de la

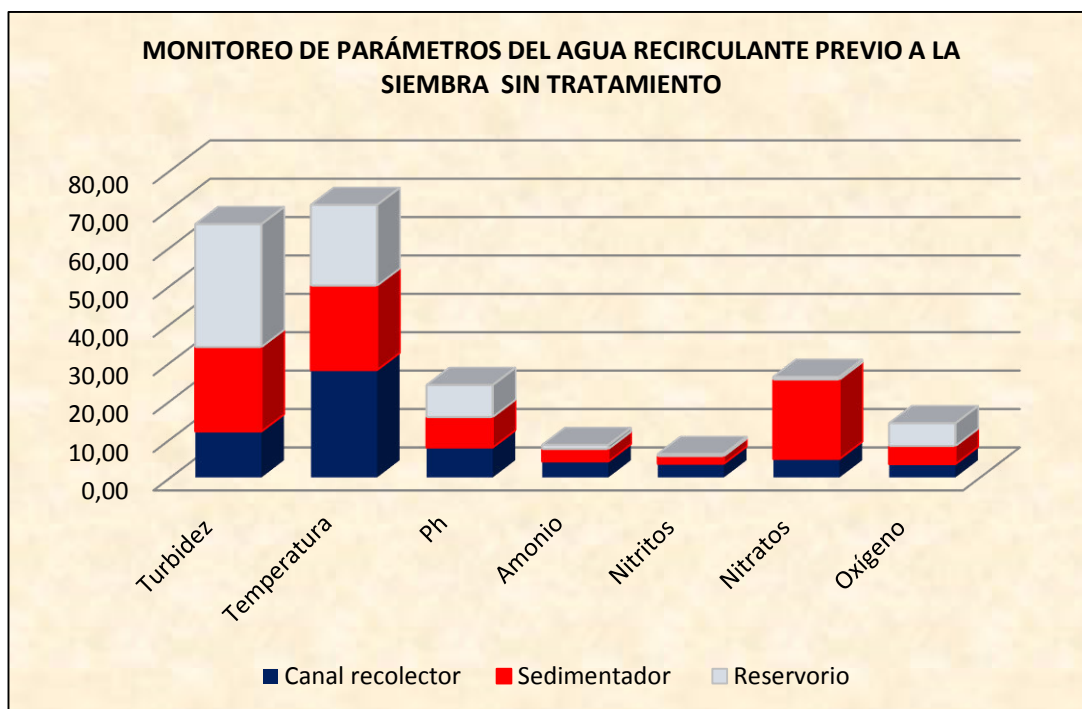
sedimentación y aeración. El amonio promedia los 4.20 mg/L, los nitritos 3.6 mg/L, al igual que los nitratos que alcanza 4.85 mg/L. En el reservorio los niveles disminuyen probablemente por efectos de la aeración que revela una concentración de oxígeno 3.50 mg/L. Con este panorama la calidad del agua se encuentra afectada y no es apta para el cultivo del camarón de acuerdo a los límites permisibles, ya que el 86% de los parámetros analizados se encuentra afectado. **(Ver Cuadro 1).**

**Cuadro 1.** Monitoreo de parámetros fisicoquímicos del agua recirculante sin tratamiento en las fases previas del periodo de diagnóstico de la calidad de agua.

MONITOREO DE PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA RECIRCULANTE SIN TRATAMIENTO								
Monitoreo del agua sin tratamiento	Fecha de monitoreo	Turbidez	Temperatura	pH	Amonio	Nitritos	Nitratos	Oxígeno
Canal recolector	14/11/2016	12,00	28,00	7,82	4,20	3,60	4,85	3,50
Sedimentador	14/11/2016	22,00	22,00	7,95	3,25	2,00	20,70	4,72
Reservorio	14/11/2016	32,00	21,00	8,30	1,00	0,50	0,68	5,90

**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

**Gráfico 1:** Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua recirculante sin tratamiento del canal recolector, sedimentador y reservorio durante el periodo de diagnóstico de la calidad del agua.



**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

#### **4.1.2. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos con biorremediación**

La adición de microbiota bioaumentada constituye la iniciación del proceso de biorremediación de la calidad del agua recirculante a utilizarse en el cultivo del camarón blanco. Se inicia en el canal de recolección del agua recirculante, en el sedimentador y en el reservorio donde se experimenta una interacción de 72 horas en cada fase con la finalidad de obtener y estabilizar la calidad del agua a límites técnicamente permisibles.

Los resultados del monitoreo en estas fases establece que la biorremediación del agua utilizando la microbiota bioaumentada tiene una eficacia del 100%, considerando que los siete parámetros evaluados registran concentraciones aceptables y estabilidad en un periodo de 72 horas.

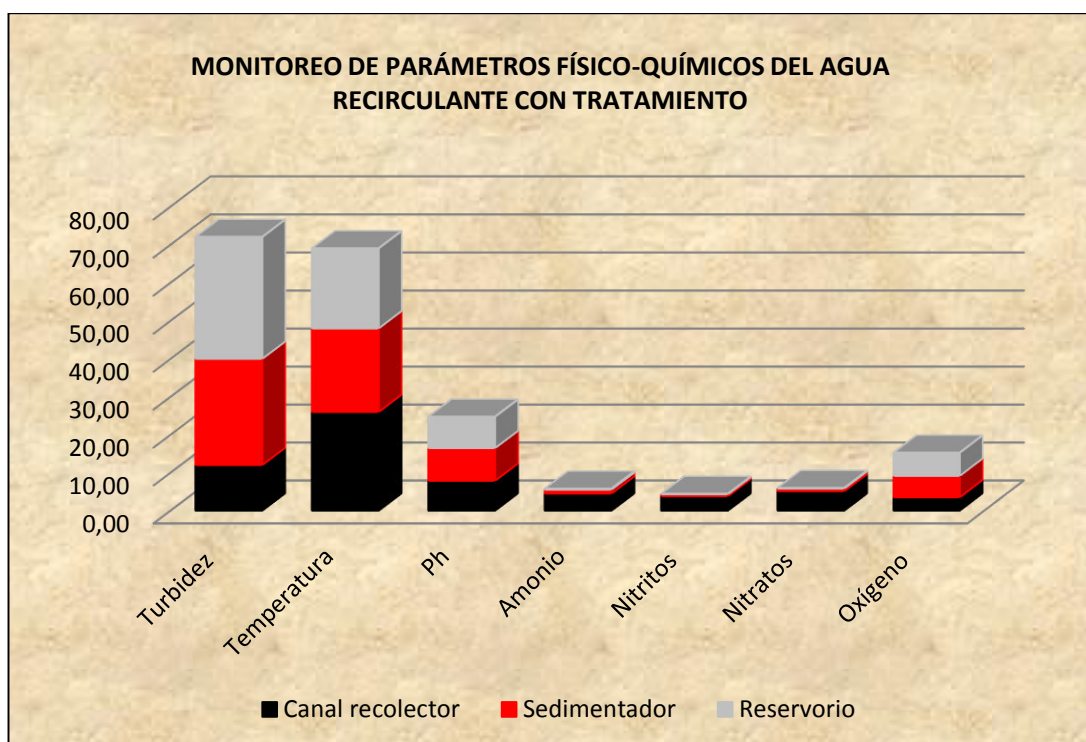
El análisis de los resultados evidencia que la turbidez luego del tratamiento varía de 12 cm en la Escala de Secchi registrada en el canal recolector de agua a 32 cm, siendo sus niveles óptimos entre 25 y 60 cm, con lo cual se mantiene visibilidad que favorece la nutrición y la salud de la población acuícola. La temperatura registra 26°C en el canal recolector disminuyendo a 21°C, lo que constituye un factor intrínseco favorable para la oxidación de la materia orgánica de forma moderada. Similar situación se evidencia para el pH que de 7.87 pasa a un nivel óptimo para la producción acuícola de 8.25. En cuanto a los parámetros tóxicos se registra 4.5 mg/L, con el tratamiento disminuye a 1.0 mg/L en el sedimentador, estabilizándose en el reservorio en 0.25 mg/L que representa una disminución del 94.5%, siendo lo permisible menor 0.1 mg/L. Los nitritos de 3.25 mg/L disminuyen a 0.1 en el reservorio lo que representa el 99.6%, siendo el referente admisible menor a 0.23 mg/L. Los nitratos de 5.12 mg/L descienden a 0.14 mg/L, siendo su valor admisible entre 0.2 a 10 mg/L que representa el 97.26%. El oxígeno disuelto de 3.50 mg/L, registra 6,08 mg/L en el reservorio que corresponde al 57.6%, siendo sus niveles admisibles entre de 5 a 15 mg/L OD. **(Ver Cuadro 2).**

**Cuadro 2.** Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua recirculante con tratamiento del canal recolector, sedimentador y reservorio durante el periodo de diagnóstico de la calidad del agua.

MONITOREO DE PARAMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL AGUA RECIRCULANTE EN FASE DE DIAGNÓSTICO DE CALIDAD									
Monitoreo del agua con tratamiento	Fecha de monitoreo	Microbiota en litros	Turbidez cm/disco	Temperatura °C	pH/ escala ácido-base	Amonio mg/L NH <sub>3</sub>	Nitritos mg/L NO <sub>2</sub>	Nitratos mg/L NO <sub>3</sub>	Oxígeno mg/L O <sub>2</sub>
Canal recolector	18/11/2016	2000,00	12,00	26,00	7,87	4,50	3,80	5,12	3,50
Sedimentador	21/11/2016	3000,00	28,00	22,00	8,60	1,00	0,50	0,68	5,65
Reservorio	24/11/2016	2000,00	32,00	21,00	8,25	0,25	0,10	0,14	6,08

**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

**Gráfico 2:** Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua recirculante con tratamiento del canal recolector, sedimentador y reservorio durante el período de diagnóstico de la calidad del agua.



**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

#### **4.1.3. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en la fase de experimentación**

Corresponde a la fase de producción del camarón por lo que el monitoreo de los parámetros fisicoquímicos se inicia en la llamada semana cero, donde además se adiciona la microbiota bioaumentada, previo la siembra de la semilla prejuvenil del camarón blanco. El monitoreo se lleva a efecto cada 48 horas y la adición de microbiota cada de 8 días en función del crecimiento del camarón en su etapa juvenil y de engorde, por lo que a partir de quinta semana se requiere mayor volumen para el tratamiento. Los resultados del

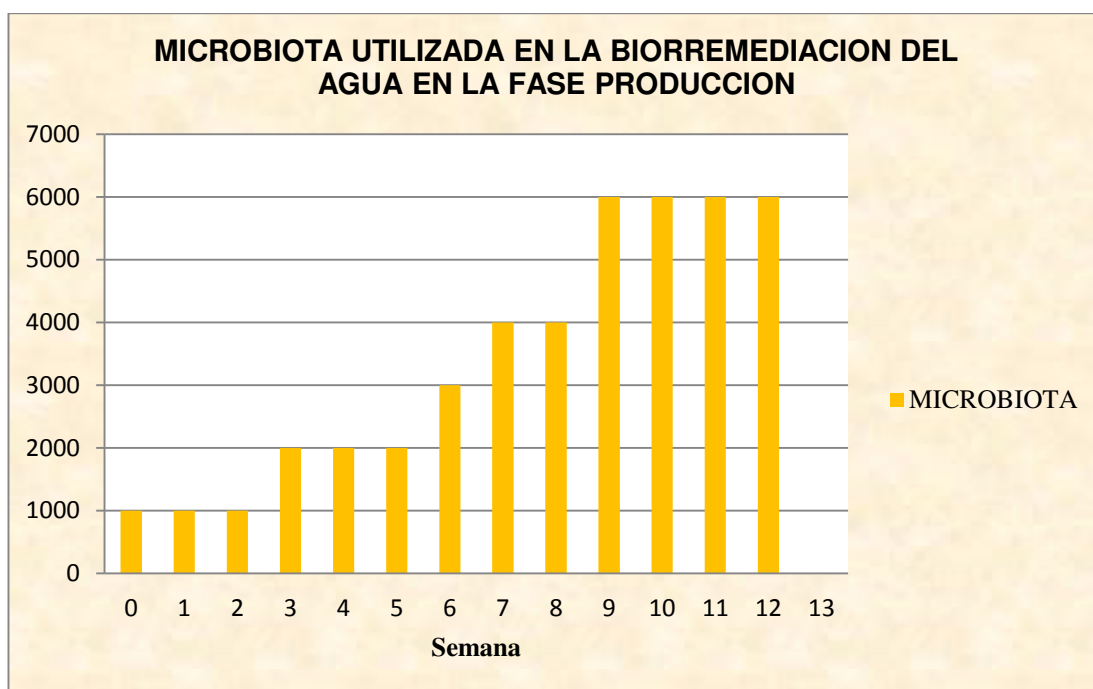
monitoreo permitieron evidenciar el nivel de eficacia de la biorremediación en 100%. Los parámetros básicos como la Turbidez, Temperatura y pH, se mantienen estables en rangos para agua acuícola de óptima calidad. Los parámetros tóxicos evidencian variabilidad en cuanto a su concentración en función de las actividades metabólicas por la nutrición y la interacción de biodiversidad microbiana que genera materia orgánica de baja densidad que se degrada sin inconvenientes favoreciendo la salud animal. El amonio en las primeras seis semanas se mantiene en promedio 0.12 mg/L de concentración, en las siguientes tres niveles experimentan aumento debido a la interacción del crustáceo y las raciones alimenticias que va en aumento siendo controlada por la adición de mayor cantidad de microbiota hasta alcanzar niveles óptimos de 0.00 mg/L. Las últimas semanas de producción se mantiene en los rangos admisibles lo que garantiza la producción. Los nitritos y nitratos mantienen igual comportamiento ya que son el resultado de la oxidación del amonio que al mantenerse en niveles óptimo no genera mayor oxidación. El oxígeno disuelto presenta niveles adecuados como producto de la aeración y la eficaz actividad biorremediadora que acelera la degradación de la materia orgánica garantizando la nutrición y la salud del crustáceo, con niveles que oscilan en rangos de 7.25 y de 10.50 mg/L de OD. Los admisibles se estiman entre 5 a 15 mg/L de O<sub>2</sub>. **(Ver Cuadro 3).**

**Cuadro 3.** Data condensada de la biorremediación del agua recirculante en la piscina de producción del camarón blanco durante el periodo de experimentación de 12 semanas.

MONITOREO DE LA BIORREMEDIACIÓN DEL AGUA EN LA PISCINA DE PRODUCCIÓN DEL CAMARÓN BLANCO										
Semanas y número de monitoreo	Fecha de monitoreo	Densidad de siembra	Microbiota en litros	Turbidez cm/disco Sc	Temperatura °C	pH/ escala ácido-base	Amonio mg/L NH3	Nitritos mg/L NO2	Nitratos mg/L NO3	Oxígeno mg/L O2
0 de 1	28/11/2016	491.700	1.000	30	24	9,00	0,00	0,00	0,00	8,55
0 de 2	30/11/2016	.....	.....	32	22	8,80	0,00	0,00	0,00	8,50
0 de 3	02/12/2016	.....	.....	40	22	8,93	0,00	0,00	0,00	7,050
1 de 4	05/12/2016	491.700	1.000	45	22	8,10	0,00	0,00	0,00	11,40
1 de 5	07/12/2016	.....	.....	42	24	8,14	0,00	0,00	0,00	10,65
1 de 6	09/12/2016	.....	.....	42	24	8,17	0,00	0,00	0,00	10,45
1 de 7	11/12/2016	.....	.....	44	20	8,20	0,00	0,00	0,00	10,33
1 de 8	12/12/2016	483.537	1.000	36	22	8,20	0,00	0,00	0,00	10,50
2 de 9	14/12/2016	.....	.....	32	18	8,19	0,00	0,00	0,00	10,04
2 de 10	16/12/2016	.....	.....	38	18	7,85	0,00	0,00	0,00	9,50
2 de 11	18/12/2016	.....	.....	38	20	7,87	0,00	0,00	0,00	9,21
3 de 12	19/12/2016	475.511	2.000	18	20	7,90	0,00	0,00	0,00	9,20
3 de 3	21/12/2016	.....	.....	20	22	7,86	0,00	0,00	0,00	9,18
3 de 14	23/12/2016	.....	.....	18	24	7,83	0,00	0,00	0,00	8,83
3 de 15	25/12/2016	.....	.....	18	24	7,80	0,00	0,00	0,00	8,81
4 de 16	26/12/2016	467.617	2.000	18.	24	7,80	0,00	0,00	0,00	8,80
4 de 17	28/12/2016	.....	.....	18	25	7,89	0,00	0,00	0,00	8,71
4 de 18	30/12/2016	.....	.....	18	25	7,85	0,00	0,00	0,00	8,34
4 de 19	01/01/2017	.....	.....	18	25	7,82	0,00	0,00	0,00	8,29
5 de 20	02/01/2017	<b>459.855</b>	.....	24	22	7,80	0,25	0,25	0,34	8,20
5 de 21	04/01/2017	.....	.....	20	24	7,83	0,25	0,25	0,36	7,98
5 de 22	06/01/2017	.....	.....	18	22	7,86	0,25	0,50	0,68	7,75
5 de 23	08/01/2017	.....	.....	18	24	7,92	0,25	0,50	0,65	7,41
6 de 24	09/01/2017	452.221	3.000	18	22	8,00	0,25	1,00	1,35	7,40
6 de 25	11/01/2017	.....	.....	18	24	8,16	0,25	1,00	1,38	7,49
6 de 26	13/01/2017	.....	.....	20	22	8,27	0,25	1,00	1,38	7,51
6 de 27	15/01/2017	.....	.....	20	24	8,30	0,25	1,00	1,40	7,62
7 de 28	16/01/2017	444.714	4.000	22	20	8,30	0,25	2,00	2,70	7,60
7 de 29	18/01/2017	.....	.....	22	20	8,26	0,25	2,00	2,68	7,83
7 de 30	20/01/2017	.....	.....	22	24	8,24	0,50	1,00	1,40	7,46
7 de 31	22/01/2017	.....	.....	22	24	8,20	0,50	1,00	1,38	7,34
8 de 32	23/01/2017	437.331	4.000	24	21	8,20	1,50	1,00	1,53	8,20
8 de 33	25/01/2017	.....	.....	28	21	8,23	1,50	0,50	0,76	8,35
8 de 34	27/01/2017	.....	.....	28	24	8,16	1,50	0,50	0,78	8,41
8 de 35	29/01/2017	.....	.....	30	24	8,03	1,50	0,50	0,78	8,47
9 de 36	30/01/2017	430.072	6.000	25	24	8,90	2,00	0,50	0,78	8,50
9 de 37	01/02/2017	.....	.....	32	24	8,74	1,00	0,25	0,80	8,75
9 de 38	03/02/2017	.....	.....	35	25	8,60	1,00	0,25	0,82	8,94
9 de 39	03/02/2017	.....	.....	38	26	8,57	1,00	0,25	0,84	9,03
10 de 40	06/02/2017	422.932	6.000	36	24	8,50	1,00	0,25	0,86	9,30
10 de 41	08/02/2017	.....	.....	36	24	8,55	0,50	0,00	0,00	9,12
10 de 42	10/02/2017	.....	.....	32	22	8,53	0,25	0,00	0,00	8,89
10 de 43	12/02/2017	.....	.....	32	22	8,50	0,00	0,00	0,00	8,63
11 de 44	13/02/2017	415.912	6.000	36	20	8,50	0,00	0,00	0,00	8,10
11 de 45	15/02/2017	.....	.....	24	20	8,49	0,00	0,00	0,00	7,94
11 de 46	17/02/2017	.....	.....	24	24	8,38	0,00	0,00	0,00	7,85
11 de 47	19/02/2017	.....	.....	24	24	8,25	0,00	0,00	0,00	7,61
12 de 48	20/02/2017	409.008	6.000	22	21	8,10	0,00	0,00	0,00	7,20
12 de 49	22/02/2017	.....	.....	22	21	8,23	0,00	0,00	0,00	7,37
12 de 50	24/02/2017	.....	.....	24	24	8,37	0,00	0,00	0,00	7,80
12 de 51	26/02/2017	.....	.....	28	24	8,41	0,00	0,00	0,00	8,40

**Fuente.** Tesis doctoral. 2016

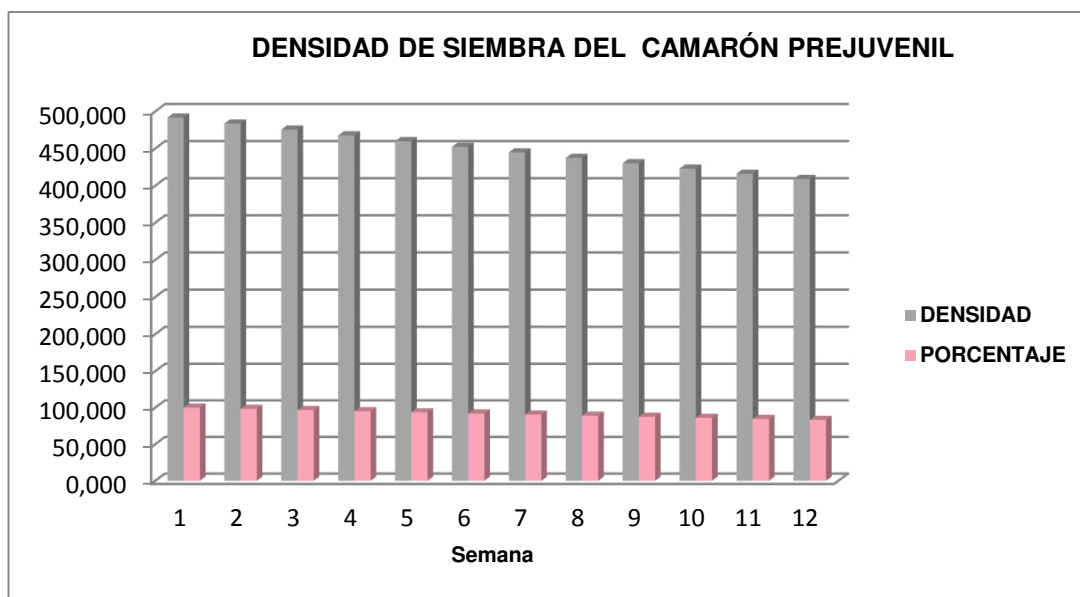
**Grafico 3.** Microbiota bioaumentada utilizada en la biorremediación del agua recirculante en la piscina de experimentación del camarón blanco durante la fase de producción.



**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

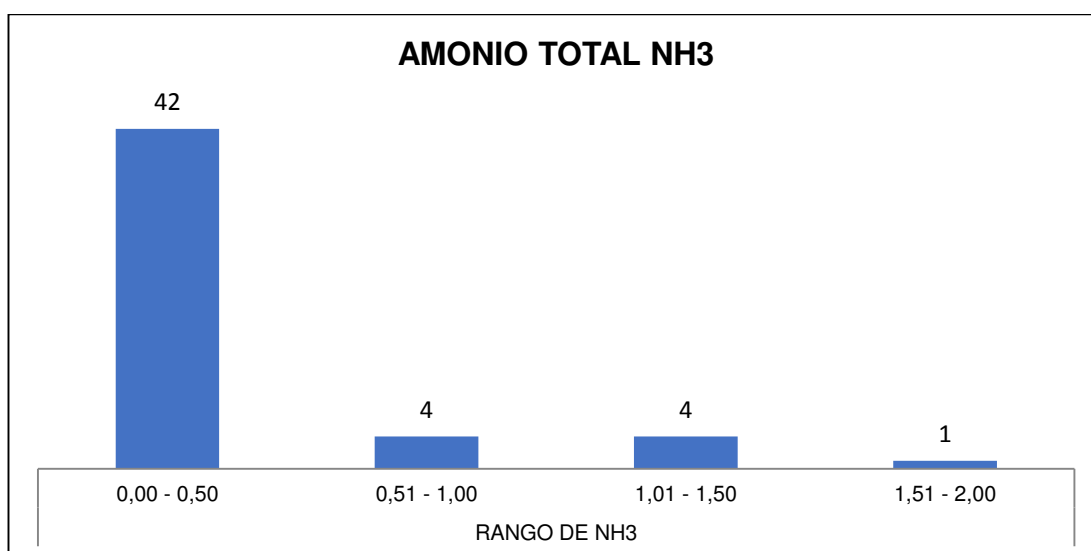
**Gráfico 4.** Densidad de la siembra del camarón prejuvenil en la piscina de experimentación del camarón blanco durante la fase de producción.





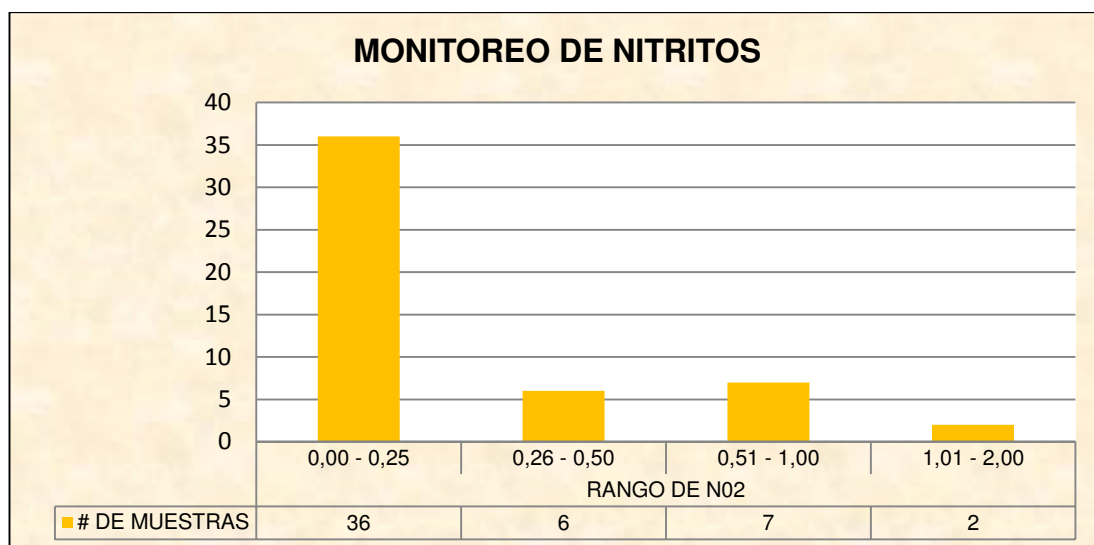
**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

**Gráfico 5.** Monitoreo del Amonio en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.



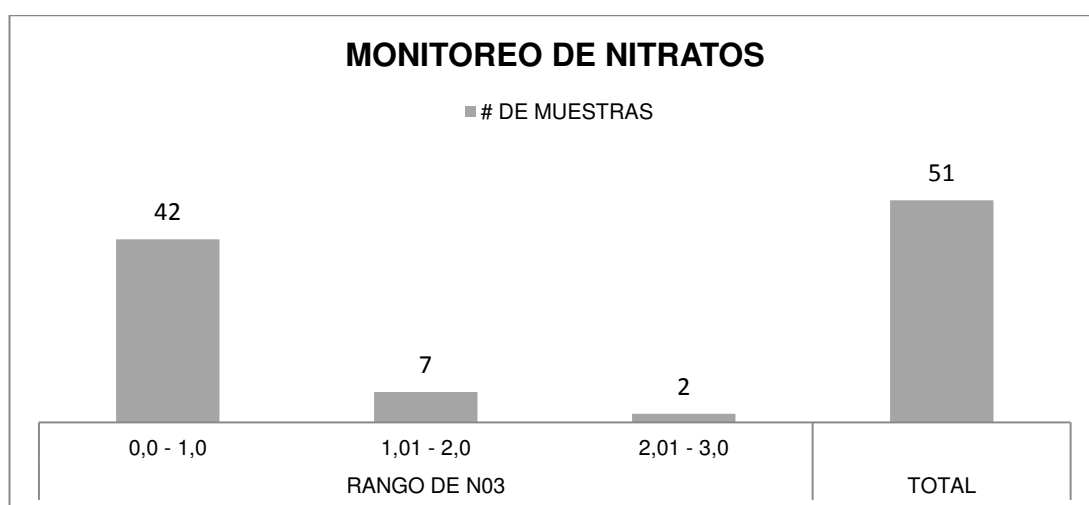
**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

**Gráfico 6.** Monitoreo de Nitritos en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.



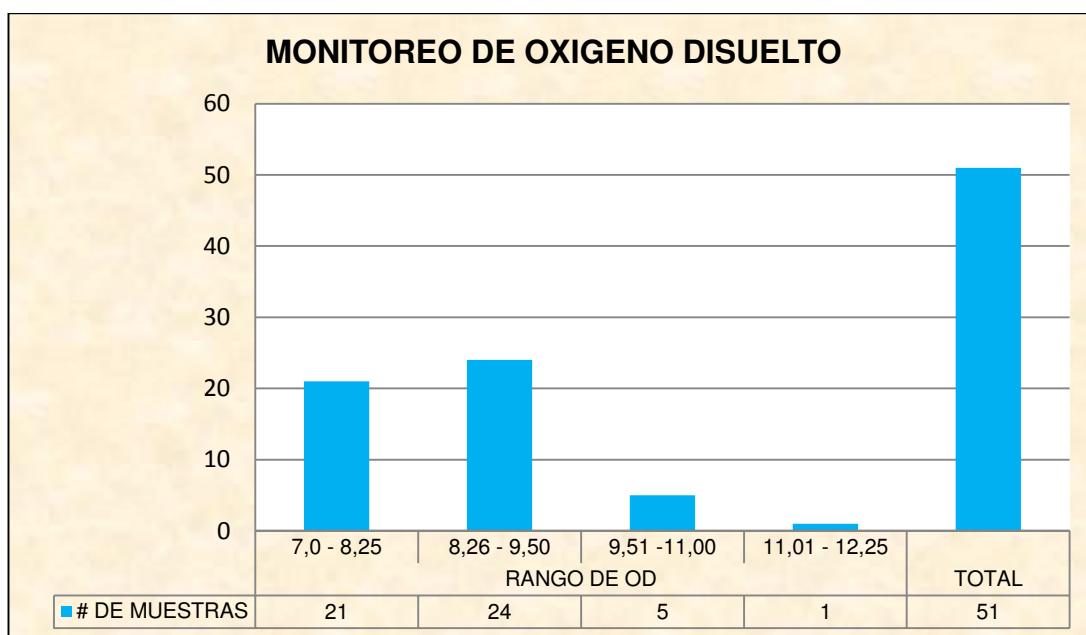
**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

**Gráfico 7.** Monitoreo de Nitratos en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.



**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

**Gráfico 8.** Monitoreo del Oxígeno Disuelto en la biorremediación del agua en la piscina de experimentación durante la fase de producción del camarón blanco.



**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

#### **4.1.4. Biodiversidad de la microbiota utilizada en la biorremediación**

El análisis de secuenciación del ADN utilizando el marcador 16S, se realizó en veintiún muestras procedente de las raíces y bentos del mangle, del sedimento acumulado en las fases de la experimentación, del cuerpo de agua y del producto final. La información obtenida tiene un alto grado de seguridad del 99.9%, de donde se puede analizar e interpretar lo siguiente:

##### **4.1.4.1. Secuencias procesadas 16S.**

Conforme el análisis bioinformático se registraron 1.367.038 secuencias de ADN en bruto. De ellas 1.329.793 son de calidad mayor a 30 ( $\geq Q$ ) y 37

menor a 30 ( $\leq 30$ ), interpretándose 30 como un valor estándar de alta calidad que permite agrupar la biodiversidad de mayor riqueza que garantiza su interpretación. Las secuencias brutas referidas al total de las secuencias analizadas se detectaron en una extensión de banda secuencial entre 52 – 582, con el 52% de bases nitrogenadas de Guanina y Citosina. Las secuencias de mayor calidad se determinó en una banda entre 200 – 518, con el 52% de GC, en la región secuencial 4 que abarca el 70%, con un porcentaje de identificación entre el 95 al 98 % de calidad mayor a 30. Se detectaron además 96.9 secuencias quimeras interpretadas como información repetida o dudosa que no interfiere la secuenciación metagenómica. **(Ver cuadro 4).**

#### **4.1.4.2.      *Secuencias asignadas en OTUS.***

De las secuencias de alta calidad procesadas se asignaron 1.232,875 a Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs). De ellas 1.030.146 corresponde a una riqueza mayor al 1% y 202 menor al 1%, que corresponde al 97.85% de la microbiota autoctona. El porcentaje mínimo asignado en OTUs es de 50.57%, contenida en la microbiota bioaumentada presente en el sedimento de la piscina de producción. Los pares mantienen el 52% de bases nitrogenadas en una extensión banda de pares de 200, en la región metagenómica 4. Los porcentajes asignados en OTUs permitieron evidenciar la mediana en 90,8, la media en 74.2 y la desviación estándar a 10.1 **(Ver Cuadro 5).**

**Cuadro 4.** Secuenciación del ADN de la microbiota utilizada en la biorremediación del agua recirculante en el cultivo de camarón blanco en cada una de las fases del proceso experimental.

SECUENCIACIÓN DEL ADN DE LA MICROBIOTA AUTÓCTONA Y BIOAUMENTADA TRAVÉS DE LA TÉCNICA ILLUMINA													
				SECUENCIAS PROCESADAS				SECUENCIAS ASIGNADAS EN OTUS					
Muestras	Fecha	Lugar de muestreo	Tipo de muestra	Secuencias Brutas	Secuencias Q>30	Secuencias Q<30	Quimeras	Secuencias en Otus	Secuencias en Otus > 0.1%	Secuencias en Otus < 0.1%	% Asignación Otus	% GC	Length
1M	18/10/2016	Ecosistema del río Chaguana.	Microbiota autóctona	99.678	98.123	1.555	588	97.535	94.441	3.094	97,85	0,52	200 bp
2M	26/10/2016	Laboratorio UTM	Microbiota bioaumentada	85.789	82.912	2.877	1.807	81.105	72.623	8.482	94,54	0,52	200 bp
3M	03/11/2016	Unidad de producción	Microbiota bioaumentada	64.567	62.578	1.989	1.898	60.680	43.799	16.881	93,98	0,52	200 bp
4M	18/11/2016	Canal recolector	Sedimento	96.789	94.567	2.222	573	93.994	93.814	180	97,11	0,52	200 bp
5M	24/11/2016	Sedimentador	Sedimento	78.967	78.143	824	1.092	77.051	76.654	397	97,57	0,52	200 bp
6M	28/11/2016	Resorvorio	Sedimento	36.511	35.681	830	2.472	33.209	23.649	9.560	90,96	0,53	200 bp
7M	05/12/2017	Piscina de producción	Agua recirculante	37.898	37.358	540	2.641	34.717	24.297	10.420	91,61	0,54	200 bp
8M	12/12/2017	Piscina de producción	Sedimento	54.190	52.970	1.220	4.201	48.769	39.756	9.013	90,00	0,52	200 bp
9M	19/12/2017	Piscina de producción	Agua recirculante	35.645	34.855	790	2.262	32.593	17.535	15.058	91,44	0,52	200 bp
10M	26/12/2017	Piscina de producción	Sedimento	78.139	76.470	1.669	36.796	39.674	36.796	2.878	50,77	0,52	200 bp
11M	02/01/2017	Piscina de producción	Agua recirculante	56.325	53.102	3.223	7.029	46.073	38.314	7.759	81,80	0,52	200 bp
12M	09/01/2017	Piscina de producción	Sedimento	106.662	104.303	2.359	6.648	97.655	59.731	37.924	91,56	0,52	200 bp
13M	16/01/2017	Piscina de producción	Agua recirculante	100.044	93.523	6.521	10.983	82.540	69.075	13.465	82,50	0,52	200 bp
14M	23/01/2017	Piscina de producción	Sedimento	89.049	87.111	1.938	3.319	83.792	78.497	5.295	94,10	0,52	200 bp
15M	30/01/2017	Piscina de producción	Agua recirculante	55.147	53.997	1.150	1.645	52.352	44.978	7.374	94,93	0,52	200 bp
16M	06/02/2017	Piscina de producción	Sedimento	37.851	37.077	774	661	36.416	31.895	4.521	96,21	0,52	200 bp
17M	13/02/2017	Piscina de producción	Agua recirculante	41.080	40.074	1.006	1.578	38.496	34.112	4.384	93,71	0,52	200 bp
18M	20/02/2017	Piscina de producción	Sedimento	81.670	79.811	1.859	2.104	77.707	68.307	9.400	95,15	0,52	200 bp
19M	26/02/2017	Piscina de producción	Agua recirculante	62.829	60.786	2.043	5.762	55.024	45.135	9.889	87,58	0,52	200 bp
20M	26/02/2017	Piscina de producción	Sedimento	43.889	42.505	1.384	2.493	40.012	15.860	24.152	91,17	0,52	200 bp
21M	30/02/2017	Piscina de producción	Camarón	24.319	23.847	472	366	23.481	20.878	2.603	96,55	0,52	200 bp
Total				1.367.038	1.329.793	37.245	96.918	1.232.875	1.030.146	202.729			

**Fuente.** Tesis doctoral 2016.

#### 4.1.5. Biodiversidad de las secuencias asignadas en OTUs

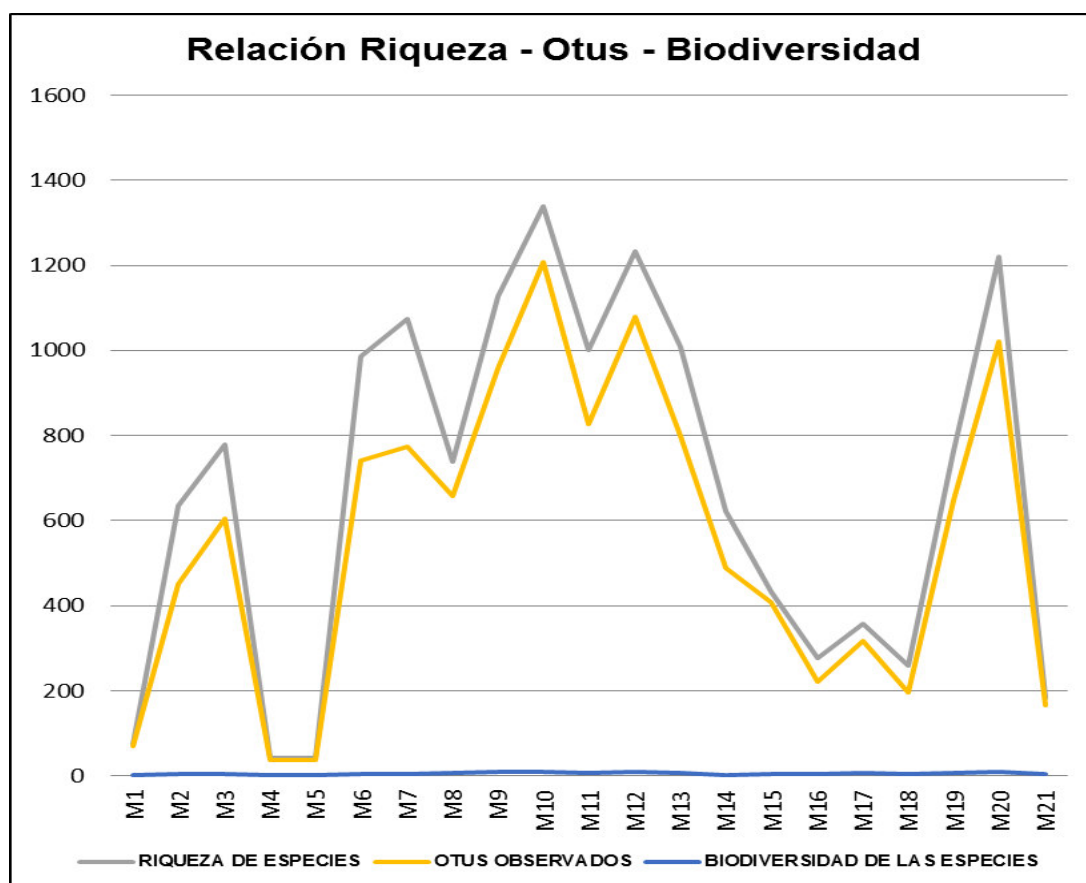
Comprende la relación existente entre las diferentes muestras secuenciadas en función de la riqueza metagenómica de cada una de ellas donde se establece que la menor riqueza se presenta en la microbiota del sedimento de la muestra 4, en el canal de desagüe con una riqueza de 42,01 especies secuenciadas asignándole 37,2 OTUs y un índice de biodiversidad 1.06 La mayor riqueza se presenta en la muestra 10 del sedimento de la piscina de producción con 1,339.58 especies, 1207, 10 OTUs asignados y un índice de riqueza de 8,80. El índice de Biodiversidad promedio es de 5,50. **(Ver Gráfico 10).**

**Cuadro 5.** Biodiversidad metagenómica de la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo de camarón blanco.

MUESTRAS	RIQUEZA DE ESPECIES	OTUs ASIGNADOS	ÍNDICE DE BIODIVERSIDAD
M1	75,10	70,80	3,18
M2	633,92	451,70	3,66
M3	779,17	604,80	4,46
M4	42,01	37,20	1,06
M5	42,23	37,00	1,09
M6	985,93	741,30	4,08
M7	1074,66	775,00	4,45
M8	739,47	658,00	7,67
M9	1126,99	957,30	8,57
M10	1339,59	1207,10	8,80
M11	1001,47	825,60	7,19
M12	1233,38	1079,10	8.50
M13	1009,47	799,50	7,73
M14	623,30	489,40	2,04
M15	433,80	408,60	5,77
M16	277,42	220,70	5,38
M17	357,50	317,40	6,99
M18	258,24	197,10	4,65
M19	762,64	647,60	7,47
M20	1220,54	1020,50	8,63
M21	184,62	166,10	4,26

**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

**Gráfico 9.** Relación la riqueza metagenómica de la microbiota, los Otus asignado e índice de biodiversidad microbiana en las diferentes fases de la experimentación.



**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

#### 4.1.6. Biodiversidad de los Niveles Taxonómicos Asignados en OTUs

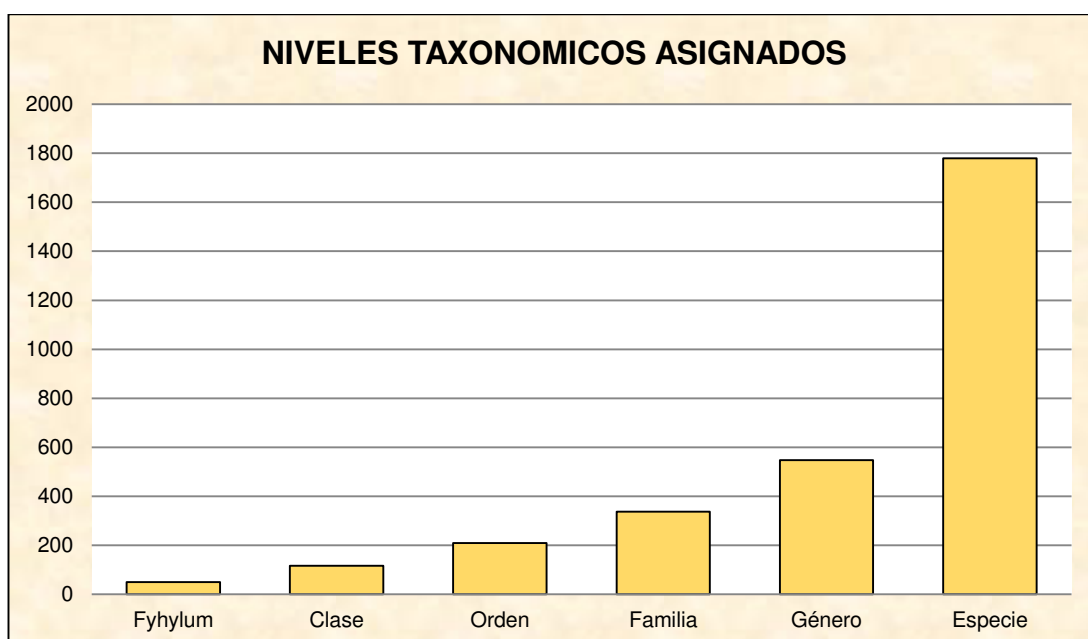
El análisis secuencial de las Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) asociadas en las veintiún muestras estableció la diversidad de niveles taxonómicos de acuerdo a lo siguiente: **Phyllum:** 49; **Clases:** 116; **Ordenes:** 209; **Familia:** 337; **Géneros:** 548; **Especies:** 1780.

**Cuadro 6.** Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) asignados a la microbiota utilizada en la biorremediación.

UNIDADES OPERACIONALES TAXONÓMICAS ANALIZADAS					
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
49	116	209	337	548	1780

**Fuente.** Tesis doctoral. 2016.

**Gráfico 10.** Niveles Taxonómicos asignados a la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en las diversas fases de la experimentación.



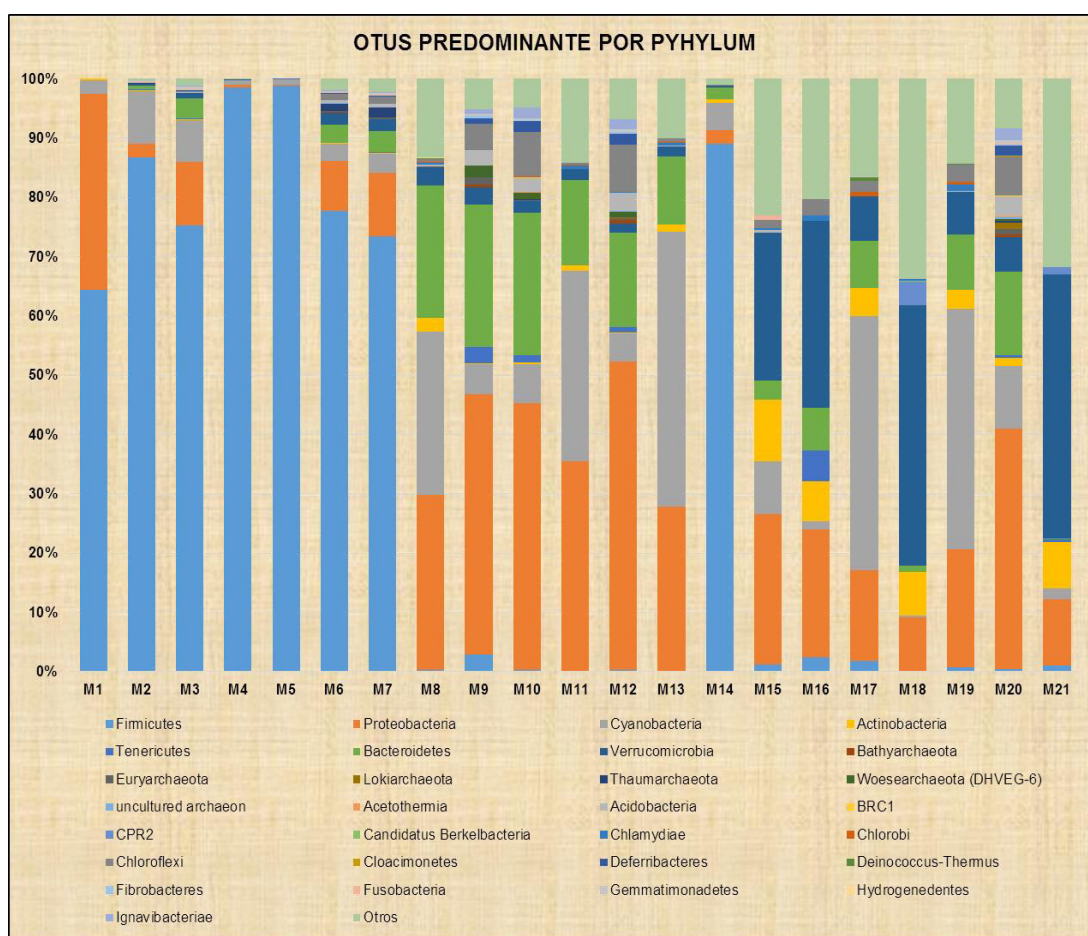
**Fuente.** Tesis doctoral 2016.



#### 4.1.6.1. OTUs predominante en el nivel taxonómico Phylum.

El análisis bioinformático de las secuencias del ADN, extraído de las muestras analizadas, se encontraron 49 tipos de unidades filogenéticas asociadas a bacterias donde el Phylum Firmicutes es el predominante con el 32.20 %; Proteobacterias 21.16 %; 12.36 % se asigna a Cyanobacterias, 7.99 % a Bacteroides; Verrucomimicrobia 8.75 % y el 17.54 corresponde a otros tipos de especímenes filogenéticos. (Ver Gráfico 10. Cuadro 5.).

**Gráfico 11.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Phylum en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación.



**Fuente:** Tesis Doctoral. 2016.

**Cuadro 7.** OTUs predominantes por Phylum en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.

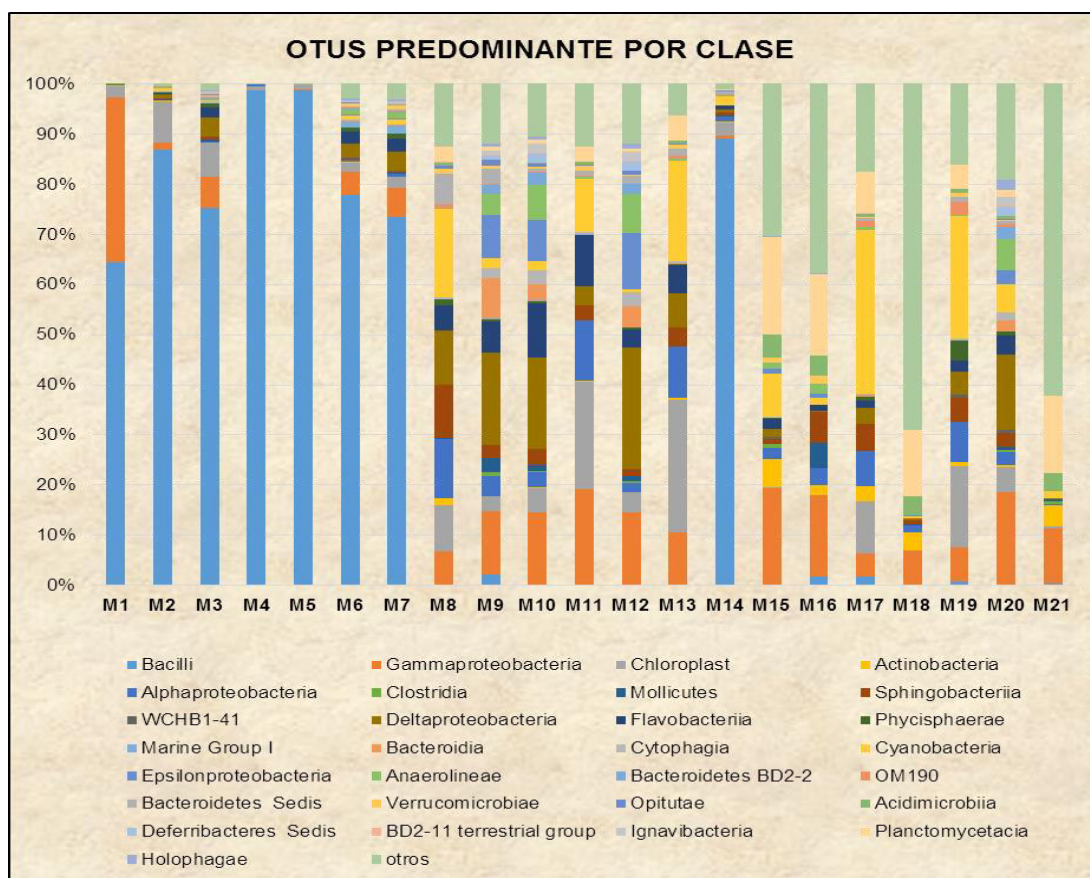
# OTUS IDENTIFICADOS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
Firmicutes	0,6445	0,8682	0,7528	0,9864	0,9878	0,7781	0,7347	0,0033	0,0286	0,0024	0,0018	0,0035	0,0012	0,8909	0,0119	0,0245	0,0181	0,0000	0,0083	0,0040	0,0108
Proteobacteria	0,3303	0,0226	0,1071	0,0043	0,0014	0,0839	0,1075	0,2954	0,4403	0,4500	0,3537	0,5193	0,2770	0,0235	0,2547	0,2150	0,1526	0,0910	0,1976	0,4057	0,1116
Cyanobacteria	0,0235	0,0891	0,0703	0,0075	0,0102	0,0284	0,0311	0,2742	0,0498	0,0657	0,3211	0,0474	0,4643	0,0458	0,0883	0,0150	0,4291	0,0043	0,4066	0,1061	0,0188
Actinobacteria	0,0017	0,0007	0,0012	-	0,0001	0,0017	0,0024	0,0235	0,0014	0,0028	0,0091	0,0014	0,0114	0,0054	0,1033	0,0670	0,0478	0,0724	0,0315	0,0127	0,0781
Tenericutes	0,0000	0,0023	0,0028	-	0,0000	0,0004	0,0005	0,0000	0,0282	0,0121	-	0,0098	0,0001	0,0001	0,0001	0,0515	-	0,0012	0,0002	0,0054	0,0043
Bacteroidetes	0,0000	0,0065	0,0336	0,0002	0,0000	0,0312	0,0353	0,2238	0,2397	0,2409	0,1440	0,1576	0,1150	0,0199	0,0331	0,0722	0,0798	0,0100	0,0933	0,1410	0,0016
Verrucomicrobia	0,0000	0,0024	0,0082	0,0009	0,0001	0,0199	0,0206	0,0309	0,0294	0,0193	0,0173	0,0167	0,0171	0,0036	0,2491	0,3147	0,0741	0,4396	0,0722	0,0569	0,4447
Bathyarchaeota	-	-	-	-	-	0,0004	0,0005	-	0,0046	0,0004	-	0,0047	-	-	-	-	-	-	-	0,0047	-
Euryarchaeota	-	0,0000	0,0002	-	-	0,0013	0,0016	0,0002	0,0116	0,0011	0,0001	0,0042	0,0000	-	0,0001	-	-	-	-	0,0090	-
Lokiarchaeota	-	-	-	-	-	0,0005	0,0006	-	0,0001	0,0003	0,0001	0,0006	-	-	-	-	-	-	-	0,0115	-
Thaumarchaeota	-	0,0020	0,0005	-	-	0,0128	0,0163	-	0,0009	0,0016	0,0002	0,0006	0,0000	-	-	-	-	-	-	0,0033	-
Woesearchaeota (DHVEG-6)	-	-	0,0001	-	-	-	0,0000	0,0001	0,0189	0,0103	0,0002	0,0097	0,0001	0,0000	-	-	-	-	-	0,0035	-
Uncultured archaeon	-	-	-	-	-	0,0008	0,0010	-	0,0013	0,0002	-	0,0010	-	-	-	-	-	-	-	0,0030	-
Acetothermia	-	-	0,0001	-	-	0,0000	0,0000	-	0,0001	0,0017	-	0,0006	-	-	-	-	-	-	-	0,0004	-
Acidobacteria	-	0,0004	0,0018	-	-	0,0046	0,0058	0,0029	0,0249	0,0233	0,0005	0,0300	0,0005	0,0000	0,0041	0,0004	-	-	0,0010	0,0347	-
BRC1	-	-	-	-	-	0,0000	-	-	0,0003	0,0008	-	0,0004	-	-	-	-	-	-	-	0,0006	-
CPR2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0003	0,0001	-	0,0003	0,0000	-	0,0001	0,0006	0,0000	0,0398	-	0,0004	0,0127
Candidatus Berkelbacteria	-	-	-	-	-	0,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0007	-	-	0,0014	-	0,0001	-
Chlamydiae	-	-	0,0000	-	-	0,0001	0,0002	0,0042	-	0,0001	0,0055	0,0002	0,0055	0,0002	0,0024	0,0085	0,0009	0,0026	0,0104	0,0002	-
Chlorobi	-	-	0,0000	-	-	0,0001	-	0,0013	0,0004	0,0009	0,0012	0,0001	0,0005	0,0001	0,0003	-	0,0068	-	0,0053	0,0002	-
Chloroflexi	-	0,0002	0,0009	-	-	0,0108	0,0115	0,0041	0,0440	0,0753	0,0038	0,0803	0,0063	0,0008	0,0140	0,0277	0,0187	0,0000	0,0288	0,0658	0,0004
Gloacimonetes	-	-	0,0000	-	-	0,0000	0,0003	-	0,0003	0,0003	-	0,0002	0,0000	-	-	-	-	-	0,0000	0,0011	-
Deferribacteres	-	0,0001	0,0011	-	-	0,0011	0,0014	0,0000	0,0081	0,0185	0,0001	0,0185	0,0002	0,0000	-	-	-	-	-	0,0170	-
Deinococcus-Thermus	-	-	0,0000	-	-	0,0001	-	0,0012	-	-	0,0001	-	0,0001	0,0001	-	-	0,0060	-	0,0009	0,0001	0,0003
Fibrobacteres	-	-	-	-	-	0,0001	0,0000	-	0,0048	0,0012	-	0,0024	0,0000	0,0000	0,0002	-	-	-	0,0000	0,0020	-
Fusobacteria	-	0,0019	0,0023	-	-	0,0013	0,0021	-	0,0001	0,0003	-	0,0003	-	-	0,0062	-	-	-	-	0,0003	-
Gemmatimonadetes	-	0,0009	0,0046	-	-	0,0023	0,0028	0,0005	0,0027	0,0028	0,0001	0,0037	0,0002	0,0001	0,0001	-	0,0013	-	0,0005	0,0072	-
Hydrogenedentes	-	-	0,0000	-	-	-	-	0,0020	0,0001	-	0,0001	-	0,0001	0,0000	-	-	-	-	0,0002	0,0001	-
Ignavibacteriae	-	0,0001	0,0016	-	-	0,0012	0,0017	-	0,0075	0,0176	0,0002	0,0176	0,0000	-	-	-	-	-	0,0001	0,0188	-
Otros	-	0,0030	0,0110	0,0010	-	0,0190	0,0220	0,1320	0,0520	0,0490	0,1410	0,0680	0,1000	0,0100	0,2310	0,2030	0,1650	0,3380	0,1430	0,0840	0,3170

**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

#### 4.1.6.2. OTUs predominante en el nivel taxonómico de Clase.

En el nivel taxonómico Clase que comprende 116 secuencias se evidencio que los cinco OTUs predominantes son: Bacillus 31.98 %; Gammaproteobacteria 10.12 %; Cianobacterias 6.25 %; Chloroplastes 6.06; Deltaproteobacteria 5.68 % y 39.91 agrupa a otros especímenes de este nivel taxonómico. (Ver Gráfico 8) (Ver Cuadro 7).

**Gráfico 12.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico de Clase en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación.



**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

**Cuadro 8.** OTUs predominantes por Clase en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.

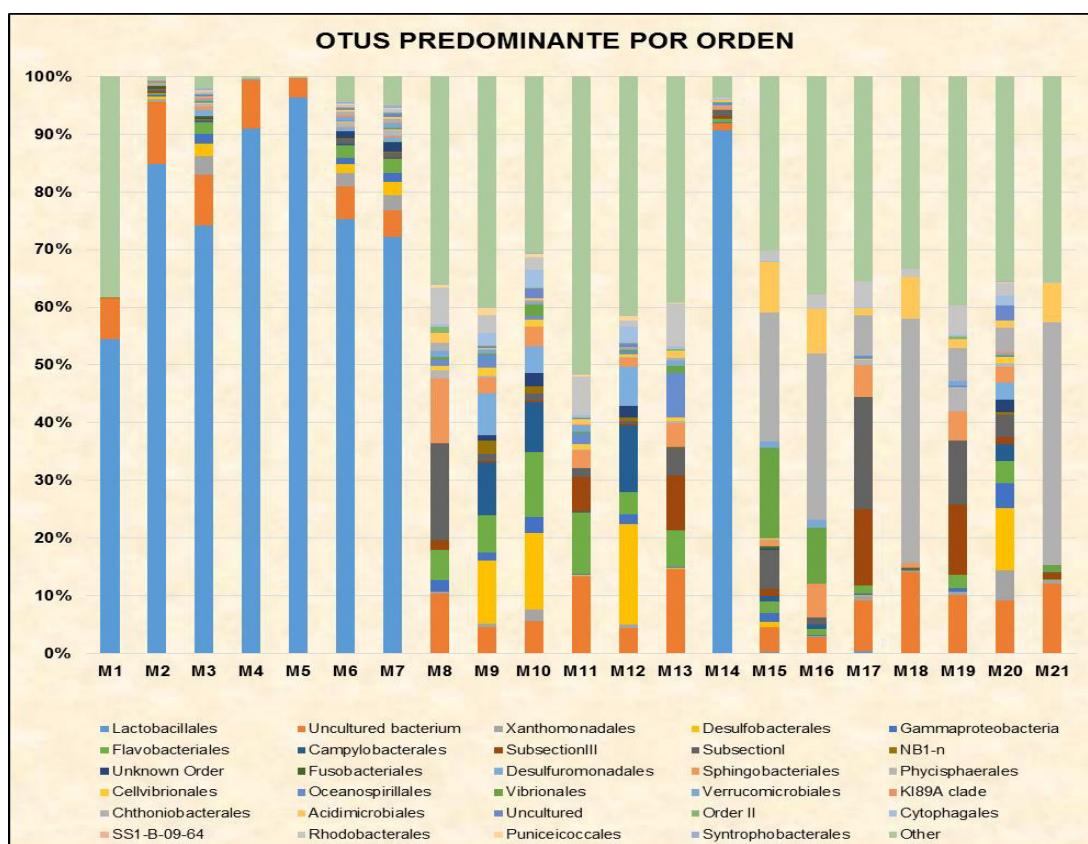
OTUS PREDOMINANTE POR CLASE																					
# OTUS IDENTIFICADOS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
Bacilli	0.6434	0.8680	0.7522	0.9864	0.9878	0.7779	0.7344	0.0023	0.0205	0.0011	0.0008	0.0007	0.0006	0.8906	0.0021	0.0166	0.0181	0.0000	0.0082	0.0004	0.0040
Gammaproteobacteria	0.3287	0.0137	0.0631	0.0001	0.0001	0.0466	0.0585	0.0661	0.1269	0.1439	0.1906	0.1446	0.1047	0.0058	0.1908	0.1634	0.0460	0.0704	0.0674	0.1844	0.1093
Chloroplast	0.0235	0.0841	0.0673	0.0075	0.0102	0.0191	0.0218	0.0917	0.0297	0.0490	0.2137	0.0402	0.2638	0.0272	0.0034	0.0000	0.1033	0.0001	0.1622	0.0510	0.0049
Actinobacteria	0.0017	0.0004	0.0004	0.0000	0.0001	0.0005	0.0006	0.0129	0.0011	0.0009	0.0036	0.0007	0.0051	0.0013	0.0561	0.0196	0.0311	0.0342	0.0084	0.0043	0.0413
Alphaproteobacteria	0.0016	0.0007	0.0015	0.0042	0.0013	0.0049	0.0060	0.1189	0.0390	0.0308	0.1190	0.0180	0.1021	0.0105	0.0210	0.0336	0.0701	0.0155	0.0803	0.0267	0.0020
Clostridia	0.0010	0.0002	0.0006	0.0000	0.0000	0.0003	0.0002	0.0010	0.0080	0.0013	0.0010	0.0029	0.0006	0.0003	0.0093	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0036	0.0065
Mollicutes	0.0000	0.0023	0.0028	0.0000	0.0000	0.0004	0.0005	0.0000	0.0282	0.0121	0.0000	0.0098	0.0001	0.0001	0.0001	0.0515	0.0000	0.0012	0.0002	0.0054	0.0043
Sphingobacteriia	0.0000	0.0015	0.0059	0.0002	0.0000	0.0018	0.0028	0.1066	0.0261	0.0330	0.0286	0.0141	0.0369	0.0068	0.0099	0.0604	0.0536	0.0085	0.0482	0.0282	0.0000
WCHB1-41	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0011	0.0018	0.0007	0.0003	0.0004	0.0001	0.0002	0.0002	0.0004	0.0024	0.0000	0.0000	0.0000	0.0058	0.0055	0.0002
Deltaproteobacteria	0.0000	0.0074	0.0396	0.0000	0.0000	0.0287	0.0382	0.1076	0.1841	0.1819	0.0398	0.2426	0.0678	0.0067	0.0165	0.0025	0.0321	0.0028	0.0455	0.1497	0.0003
Flavobacteriia	0.0000	0.0033	0.0200	0.0000	0.0000	0.0231	0.0253	0.0501	0.0620	0.1087	0.1007	0.0370	0.0556	0.0063	0.0204	0.0118	0.0130	0.0015	0.0224	0.0388	0.0006
Phycisphaerae	0.0000	0.0013	0.0066	0.0000	0.0000	0.0086	0.0105	0.0129	0.0049	0.0037	0.0015	0.0044	0.0037	0.0010	0.0020	0.0000	0.0098	0.0000	0.0401	0.0080	0.0000
Marine Group I	0.0000	0.0020	0.0005	0.0000	0.0000	0.0127	0.0161	0.0000	0.0006	0.0008	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0000
Bacteroidia	0.0000	0.0002	0.0008	0.0000	0.0000	0.0013	0.0014	0.0001	0.0804	0.0326	0.0004	0.0420	0.0003	0.0001	0.0006	0.0000	0.0039	0.0000	0.0000	0.0223	0.0010
Cytophagia	0.0000	0.0005	0.0026	0.0000	0.0000	0.0011	0.0015	0.0044	0.0202	0.0288	0.0042	0.0267	0.0054	0.0003	0.0018	0.0000	0.0019	0.0000	0.0029	0.0160	0.0000
Cyanobacteria	0.0000	0.0050	0.0030	0.0000	0.0000	0.0092	0.0093	0.1759	0.0200	0.0166	0.1067	0.0072	0.1990	0.0183	0.0850	0.0150	0.3258	0.0042	0.2443	0.0551	0.0138
Epsilonproteobacteria	0.0000	0.0003	0.0008	0.0000	0.0000	0.0021	0.0026	0.0001	0.0867	0.0837	0.0003	0.1117	0.0002	0.0001	0.0098	0.0072	0.0000	0.0006	0.0004	0.0289	0.0000
Anaerolineae	0.0000	0.0002	0.0009	0.0000	0.0000	0.0103	0.0108	0.0018	0.0425	0.0694	0.0030	0.0776	0.0037	0.0005	0.0127	0.0209	0.0064	0.0000	0.0022	0.0604	0.0000
Bacteroidetes BD2-2	0.0000	0.0002	0.0022	0.0000	0.0000	0.0020	0.0020	0.0000	0.0178	0.0237	0.0001	0.0200	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0255	0.0000
OM190	0.0000	0.0006	0.0016	0.0000	0.0000	0.0018	0.0026	0.0079	0.0009	0.0018	0.0029	0.0007	0.0068	0.0019	0.0002	0.0000	0.0116	0.0000	0.0249	0.0063	0.0000
Bacteroidetes Sedis	0.0000	0.0007	0.0016	0.0000	0.0000	0.0008	0.0013	0.0606	0.0307	0.0065	0.0086	0.0157	0.0145	0.0058	0.0000	0.0001	0.0067	0.0000	0.0117	0.0042	0.0000
Verrucomicrobiae	0.0000	0.0006	0.0032	0.0009	0.0001	0.0064	0.0077	0.0103	0.0060	0.0034	0.0107	0.0016	0.0078	0.0015	0.0104	0.0149	0.0017	0.0000	0.0076	0.0028	0.0000
Opitutae	0.0000	0.0005	0.0018	0.0000	0.0000	0.0015	0.0017	0.0043	0.0119	0.0067	0.0028	0.0075	0.0020	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0022	0.0000
Acidimicrobia	0.0000	0.0003	0.0007	0.0000	0.0000	0.0010	0.0016	0.0075	0.0003	0.0016	0.0047	0.0005	0.0051	0.0013	0.0462	0.0402	0.0052	0.0382	0.0072	0.0062	0.0358
Deferribacteres Sedis	0.0000	0.0001	0.0011	0.0000	0.0000	0.0011	0.0014	0.0000	0.0081	0.0185	0.0001	0.0185	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0170	0.0000
BD2-11 terrestrial	0.0000	0.0005	0.0021	0.0000	0.0000	0.0011	0.0015	0.0005	0.0013	0.0016	0.0001	0.0026	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0013	0.0000	0.0005	0.0020	0.0000
Ignavibacteria	0.0000	0.0001	0.0016	0.0000	0.0000	0.0012	0.0017	0.0000	0.0075	0.0176	0.0002	0.0176	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0188	0.0000
Planctomycetacia	0.0000	0.0002	0.0004	0.0000	0.0000	0.0008	0.0009	0.0302	0.0092	0.0095	0.0310	0.0063	0.0495	0.0012	0.1928	0.1636	0.0822	0.1336	0.0483	0.0141	0.1542
Holophagae	0.0000	0.0003	0.0014	0.0000	0.0000	0.0027	0.0030	0.0000	0.0056	0.0059	0.0001	0.0095	0.0001	0.0000	0.0033	0.0003	0.0000	0.0000	0.0001	0.0199	0.0000
otros	0.0000	0.0047	0.0137	0.0007	0.0004	0.0300	0.0321	0.1258	0.1195	0.1044	0.1246	0.1190	0.0637	0.0115	0.3031	0.3785	0.1763	0.6893	0.1605	0.1914	0.6218

**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

#### 4.1.6.3. OTUs predominante en el nivel taxonómico Orden.

En este nivel taxonómico conformado por 209 secuencias se evidencia que los cinco OTUs predominantes son: Lactobacilos con 31,33; Uncultured bacterium 7,74 %; Chthoniobacteriales 7,71; Subsectionil 5,51; Flavobacteriales 2,86% y otros orden comprenden el 44.85. (Ver Gráfico 9) (Ver Cuadro 8).

**Gráfico 13.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Orden en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas las fases de experimentación.



**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.



**Cuadro 9.** Otus predominantes por Orden en la microbiota autóctona y bioacumulada utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.

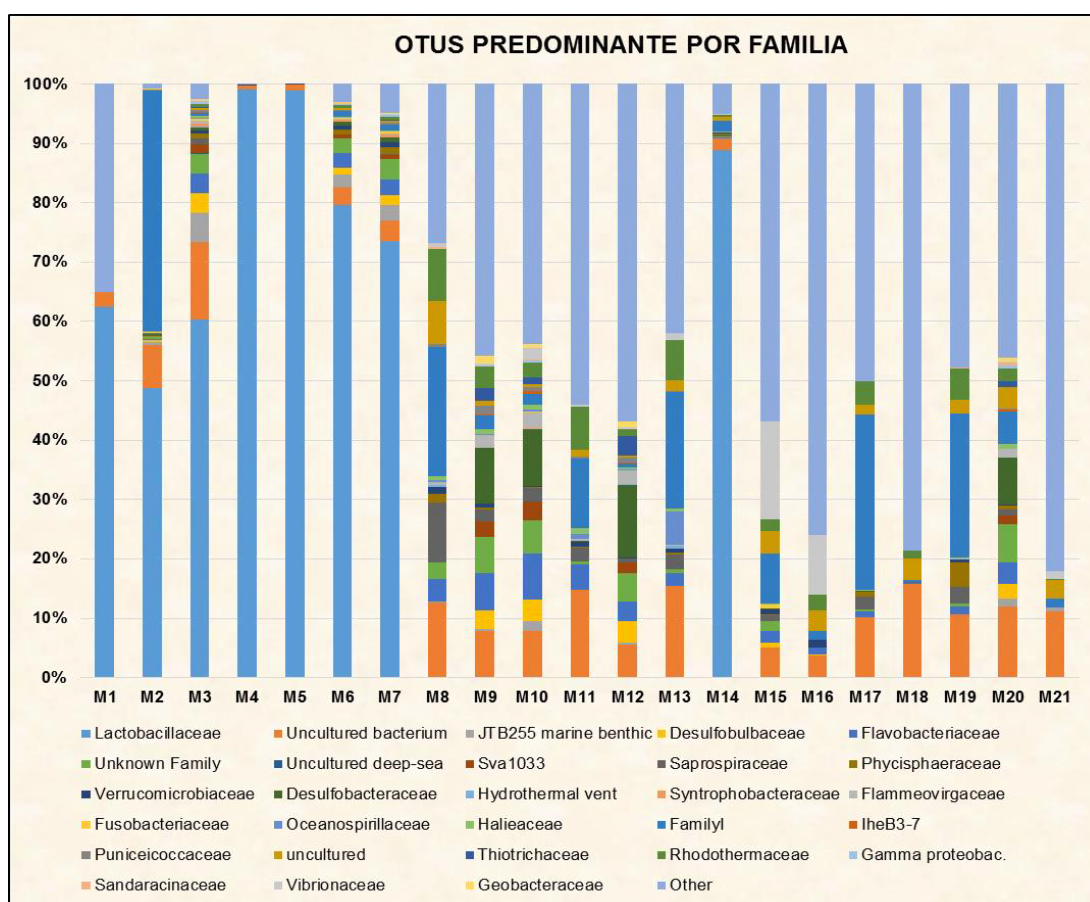
# OTUS IDENTIFICADOS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
Lactobacillales	0,5721	0,8680	0,7522	0,9863	0,9876	0,7777	0,7342	0,0007	0,0010	0,0006	0,0008	0,0005	0,0006	0,8906	0,0015	0,0001	0,0036	0,0000	0,0013	0,0001	0,0005
Uncultured bacterium	0,0733	0,1090	0,0900	0,0909	0,0350	0,0590	0,0467	0,0976	0,0419	0,0545	0,1250	0,0417	0,1290	0,0125	0,0455	0,0291	0,0847	0,1470	0,0965	0,0898	0,1270
Xanthomonadales	0,0015	0,0054	0,0315	0,0000	0,0000	0,0227	0,0276	0,0030	0,0068	0,0196	0,0020	0,0057	0,0020	0,0002	0,0011	0,0017	0,0067	0,0004	0,0046	0,0520	0,0072
Desulfobacterales	0,0000	0,0044	0,0227	0,0000	0,0000	0,0167	0,0228	0,0002	0,1040	0,1280	0,0008	0,1675	0,0007	0,0001	0,0094	0,0008	0,0013	0,0000	0,0008	0,1062	0,0000
Gammaproteobacteria	0,0000	0,0036	0,0176	0,0000	0,0000	0,0105	0,0154	0,0192	0,0122	0,0271	0,0021	0,0158	0,0022	0,0005	0,0165	0,0010	0,0036	0,0000	0,0051	0,0424	0,0000
Flavobacteriales	0,0000	0,0033	0,0200	0,0000	0,0000	0,0231	0,0253	0,0501	0,0620	0,1087	0,1007	0,0370	0,0556	0,0063	0,0204	0,0118	0,0130	0,0015	0,0224	0,0388	0,0006
Campylobacterales	0,0000	0,0003	0,0008	0,0000	0,0000	0,0021	0,0026	0,0001	0,0867	0,0837	0,0003	0,1117	0,0002	0,0001	0,0098	0,0072	0,0000	0,0006	0,0004	0,0289	0,0000
SubsectionIII	0,0000	0,0026	0,0010	0,0000	0,0000	0,0011	0,0017	0,0154	0,0031	0,0039	0,0568	0,0020	0,0861	0,0041	0,0121	0,0000	0,1270	0,0007	0,1176	0,0121	0,0124
SubsectionI	0,0000	0,0024	0,0019	0,0000	0,0000	0,0080	0,0075	0,1598	0,0117	0,0111	0,0149	0,0047	0,0430	0,0105	0,0726	0,0141	0,1866	0,0035	0,1065	0,0381	0,0010
NB1-n	0,0000	0,0023	0,0027	0,0000	0,0000	0,0004	0,0005	0,0000	0,0217	0,0117	0,0000	0,0067	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0043	0,0000
Unknown Order	0,0000	0,0021	0,0017	0,0000	0,0000	0,0127	0,0164	0,0000	0,0089	0,0234	0,0003	0,0187	0,0002	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0206	0,0000
Fusobacteriales	0,0000	0,0019	0,0023	0,0000	0,0000	0,0013	0,0021	0,0000	0,0001	0,0003	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0062	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000
Desulfuromonadales	0,0000	0,0018	0,0107	0,0000	0,0000	0,0063	0,0079	0,0001	0,0698	0,0435	0,0003	0,0655	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0289	0,0000
Sphingobacteriales	0,0000	0,0015	0,0059	0,0002	0,0000	0,0018	0,0028	0,1066	0,0261	0,0330	0,0286	0,0141	0,0369	0,0068	0,0099	0,0604	0,0536	0,0085	0,0482	0,0282	0,0000
Phycisphaerales	0,0000	0,0012	0,0053	0,0000	0,0000	0,0073	0,0093	0,0129	0,0027	0,0012	0,0015	0,0010	0,0037	0,0010	0,0020	0,0000	0,0098	0,0000	0,0401	0,0065	0,0000
Cellvibrionales	0,0000	0,0008	0,0021	0,0000	0,0000	0,0012	0,0021	0,0073	0,0131	0,0117	0,0085	0,0049	0,0056	0,0009	0,0014	0,0000	0,0006	0,0000	0,0012	0,0101	0,0002
Oceanospirillales	0,0000	0,0007	0,0014	0,0000	0,0000	0,0012	0,0007	0,0108	0,0213	0,0057	0,0180	0,0054	0,0683	0,0029	0,0000	0,0000	0,0043	0,0000	0,0018	0,0018	0,0000
Vibrionales	0,0000	0,0006	0,0011	0,0001	0,0000	0,0009	0,0013	0,0049	0,0021	0,0198	0,0029	0,0026	0,0116	0,0003	0,1655	0,1010	0,0001	0,0000	0,0002	0,0014	0,0133
Verrucomicrobiales	0,0000	0,0006	0,0032	0,0009	0,0001	0,0064	0,0077	0,0103	0,0060	0,0034	0,0107	0,0016	0,0078	0,0015	0,0104	0,0149	0,0017	0,0000	0,0076	0,0028	0,0000
KI89A clade	0,0000	0,0006	0,0026	0,0000	0,0000	0,0025	0,0020	0,0001	0,0009	0,0021	0,0001	0,0009	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0035	0,0000
Chthoniobacterales	0,0000	0,0006	0,0008	0,0000	0,0000	0,0074	0,0065	0,0129	0,0013	0,0013	0,0007	0,0013	0,0044	0,0011	0,2347	0,2998	0,0675	0,4396	0,0556	0,0399	0,4445
Acidimicrobiales	0,0000	0,0001	0,0015	0,0000	0,0000	0,0020	0,0033	0,0151	0,0006	0,0033	0,0094	0,0010	0,0102	0,0026	0,0924	0,0804	0,0104	0,0763	0,0144	0,0125	0,0717
Uncultured	0,0000	0,0006	0,0031	0,0000	0,0000	0,0044	0,0061	0,0001	0,0039	0,0160	0,0003	0,0058	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0265	0,0000
Order II	0,0000	0,0005	0,0014	0,0000	0,0000	0,0005	0,0011	0,0102	0,0007	0,0025	0,0021	0,0003	0,0024	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0036	0,0004	0,0000
Cytophagales	0,0000	0,0005	0,0026	0,0000	0,0000	0,0011	0,0015	0,0044	0,0202	0,0288	0,0042	0,0267	0,0054	0,0003	0,0018	0,0000	0,0019	0,0000	0,0029	0,0160	0,0000
SS1-B-09-64	0,0000	0,0005	0,0013	0,0000	0,0000	0,0010	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000
Rhodobacterales	0,0000	0,0005	0,0011	0,0000	0,0000	0,0033	0,0042	0,0602	0,0293	0,0214	0,0622	0,0107	0,0649	0,0031	0,0189	0,0264	0,0432	0,0133	0,0489	0,0204	0,0016
Puniceococcales	0,0000	0,0005	0,0018	0,0000	0,0000	0,0015	0,0017	0,0043	0,0119	0,0067	0,0028	0,0075	0,0020	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0022	0,0000
Syntrophobacterales	0,0000	0,0004	0,0026	0,0000	0,0000	0,0030	0,0042	0,0000	0,0002	0,0010	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000
Other	0,4029	0,0053	0,0214	0,0051	0,0021	0,0455	0,0514	0,3437	0,3827	0,2969	0,4895	0,3987	0,3505	0,0359	0,3163	0,3940	0,3414	0,3468	0,3828	0,3500	0,3780

**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

#### 4.1.6.4. OTUs predominantes en el nivel taxonómico de Familia.

Para este nivel taxonómico las Unidades Taxonómicas Operacionales analizadas la familia de mayor incidencia corresponde a Lactobacillaceas con el 27,61; Familyl bacterium 8,60; Uncultured bacterium 7,46; Leucoconoscacease 3,63 Rhodothermaceae 2,19 y otras familias agrupan el 50,51 (Ver Gráfico 10) (Ver Cuadro 9).

**Gráfico 14.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Phylum en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas las fases de experimentación.



**Fuente:** Tesis Doctoral. Torres W. 2016. UTMachala.

**Cuadro 10.** OTUs predominantes por Familia en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco.

OTUS PREDOMINANTE POR FAMILIA																					
# OTUS IDENTIFICADOS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
Leuconostocaceae	2E-05	3E-01	4E-01	4E-03	3E-03	4E-02	6E-02	0E+00	0E+00	5E-05	0E+00	0E+00	7E-05	1E-05	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00
Lactobacillaceae	6E-01	6E-01	4E-01	1E+00	1E+00	7E-01	7E-01	6E-04	1E-03	5E-04	8E-04	5E-04	5E-04	9E-01	0E+00	0E+00	0E+00	1E-05	0E+00	6E-05	0E+00
Uncultured bacterium	2E-02	9E-02	8E-02	7E-03	1E-02	3E-02	3E-02	1E-01	6E-02	8E-02	1E-01	6E-02	2E-01	2E-02	5E-02	4E-02	1E-01	2E-01	1E-01	1E-01	1E-01
JTB255 marine benthic	0E+00	5E-03	3E-02	0E+00	0E+00	2E-02	2E-02	1E-03	3E-03	2E-02	7E-04	3E-03	7E-04	3E-05	6E-04	2E-04	0E+00	4E-04	1E-04	1E-02	7E-03
Desulfobulbaceae	0E+00	4E-03	2E-02	0E+00	0E+00	1E-02	2E-02	8E-05	3E-02	4E-02	1E-04	4E-02	2E-04	1E-05	8E-03	8E-04	0E+00	0E+00	1E-04	3E-02	0E+00
Flavobacteriaceae	0E+00	3E-03	2E-02	1E-05	1E-05	2E-02	2E-02	3E-02	5E-02	8E-02	4E-02	3E-02	2E-02	3E-03	2E-02	1E-02	1E-02	2E-03	1E-02	4E-02	6E-04
Unknown Family	0E+00	6E-03	2E-02	0E+00	0E+00	2E-02	3E-02	2E-02	5E-02	5E-02	4E-03	5E-02	7E-03	1E-03	2E-02	1E-03	4E-03	0E+00	5E-03	7E-02	0E+00
Uncultured deep-sea	0E+00	1E-04	1E-03	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00
Sva1033	0E+00	1E-03	9E-03	0E+00	0E+00	5E-03	7E-03	0E+00	2E-02	3E-02	2E-04	2E-02	9E-05	3E-05	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	2E-04	1E-02	0E+00
Saprospiraceae	1E-05	1E-03	5E-03	2E-04	1E-05	1E-03	2E-03	8E-02	2E-02	2E-02	2E-02	6E-03	2E-02	4E-03	9E-03	0E+00	2E-02	8E-04	3E-02	1E-02	0E+00
Phycisphaeraceae	0E+00	1E-03	5E-03	0E+00	0E+00	7E-03	9E-03	1E-02	3E-03	1E-03	2E-03	1E-03	4E-03	1E-03	2E-03	0E+00	1E-02	0E+00	4E-02	6E-03	0E+00
Verrucomicrobiaceae	0E+00	6E-04	3E-03	9E-04	7E-05	6E-03	8E-03	8E-03	5E-03	3E-03	9E-03	9E-04	6E-03	1E-03	9E-03	1E-02	0E+00	0E+00	5E-03	2E-03	5E-05
Desulfobacteraceae	0E+00	6E-04	3E-03	0E+00	0E+00	5E-03	8E-03	1E-04	8E-02	9E-02	6E-04	1E-01	6E-04	8E-05	2E-03	3E-05	1E-03	4E-05	7E-04	8E-02	0E+00
Hydrothermal vent	0E+00	2E-04	1E-03	0E+00	0E+00	8E-04	1E-03	4E-03	1E-04	6E-04	9E-04	3E-04	4E-03	4E-04	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	2E-04	0E+00
Syntrophobacteraceae	0E+00	4E-04	3E-03	0E+00	0E+00	3E-03	4E-03	0E+00	1E-04	5E-04	0E+00	1E-04	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	6E-04	0E+00
Flammeovirgaceae	0E+00	5E-04	3E-03	0E+00	0E+00	1E-03	1E-03	3E-03	2E-02	3E-02	3E-03	3E-02	3E-03	2E-04	2E-04	0E+00	7E-04	0E+00	1E-03	1E-02	0E+00
Fusobacteriaceae	0E+00	2E-03	2E-03	0E+00	0E+00	1E-03	2E-03	0E+00	6E-05	3E-04	0E+00	3E-04	0E+00	0E+00	6E-03	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	3E-04	0E+00
Oceanospirillaceae	0E+00	6E-04	1E-03	0E+00	0E+00	6E-04	4E-04	3E-03	2E-03	4E-03	8E-03	7E-04	6E-02	3E-04	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	5E-04	6E-04	0E+00
Haliaceae	0E+00	8E-04	2E-03	0E+00	0E+00	1E-03	2E-03	6E-03	6E-03	9E-03	8E-03	3E-03	6E-03	9E-04	1E-03	0E+00	6E-04	0E+00	1E-03	9E-03	2E-04
FamilyI	0E+00	5E-01	3E-03	3E-05	0E+00	9E-03	9E-03	2E-01	2E-02	2E-02	1E-01	7E-03	2E-01	2E-02	8E-02	1E-02	3E-01	4E-03	2E-01	5E-02	1E-02
IheB3-7	0E+00	1E-04	1E-03	0E+00	0E+00	1E-04	3E-04	0E+00	8E-04	5E-03	0E+00	3E-03	1E-05	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	3E-03	0E+00
Puniceicoccaceae	0E+00	5E-04	2E-03	0E+00	0E+00	1E-03	2E-03	4E-03	1E-02	7E-03	3E-03	8E-03	2E-03	5E-04	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	3E-04	2E-03	0E+00
uncultured	0E+00	5E-04	2E-03	1E-05	0E+00	3E-03	4E-03	6E-02	7E-03	6E-03	1E-02	4E-03	2E-02	7E-03	4E-02	3E-02	2E-02	4E-02	2E-02	4E-02	3E-02
Thiotrichaceae	0E+00	1E-04	1E-03	0E+00	0E+00	6E-04	8E-04	0E+00	2E-02	1E-02	1E-04	3E-02	4E-05	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	1E-02	0E+00
Rhodothermaceae	0E+00	9E-04	2E-03	0E+00	0E+00	4E-03	5E-03	7E-02	3E-02	2E-02	6E-02	1E-02	7E-02	4E-03	2E-02	3E-02	4E-02	1E-02	5E-02	2E-02	2E-03
Gamma proteobac.	0E+00	3E-04	2E-03	0E+00	0E+00	2E-03	3E-03	0E+00	1E-03	2E-03	5E-05	8E-04	1E-05	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	4E-05	5E-03	0E+00
Sandaracinaceae	0E+00	2E-04	1E-03	0E+00	0E+00	6E-04	5E-04	3E-03	5E-04	1E-03	3E-04	5E-04	6E-04	3E-05	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	1E-03	6E-03	0E+00
Vibrionaceae	0E+00	6E-04	1E-03	1E-04	0E+00	9E-04	1E-03	5E-03	2E-03	2E-02	3E-03	3E-03	1E-02	3E-04	2E-01	1E-01	6E-05	1E-05	2E-04	1E-03	1E-02
Geobacteraceae	0E+00	2E-04	1E-03	0E+00	0E+00	6E-04	7E-04	3E-05	1E-02	7E-03	3E-05	1E-02	1E-05	1E-05	0E+00	0E+00	0E+00	0E+00	2E-05	6E-03	0E+00
Other	3E-01	1E-02	2E-02	1E-03	1E-04	3E-02	5E-02	2E-01	4E-01	4E-01	5E-01	6E-01	4E-01	5E-02	6E-01	8E-01	6E-01	8E-01	5E-01	5E-01	8E-01

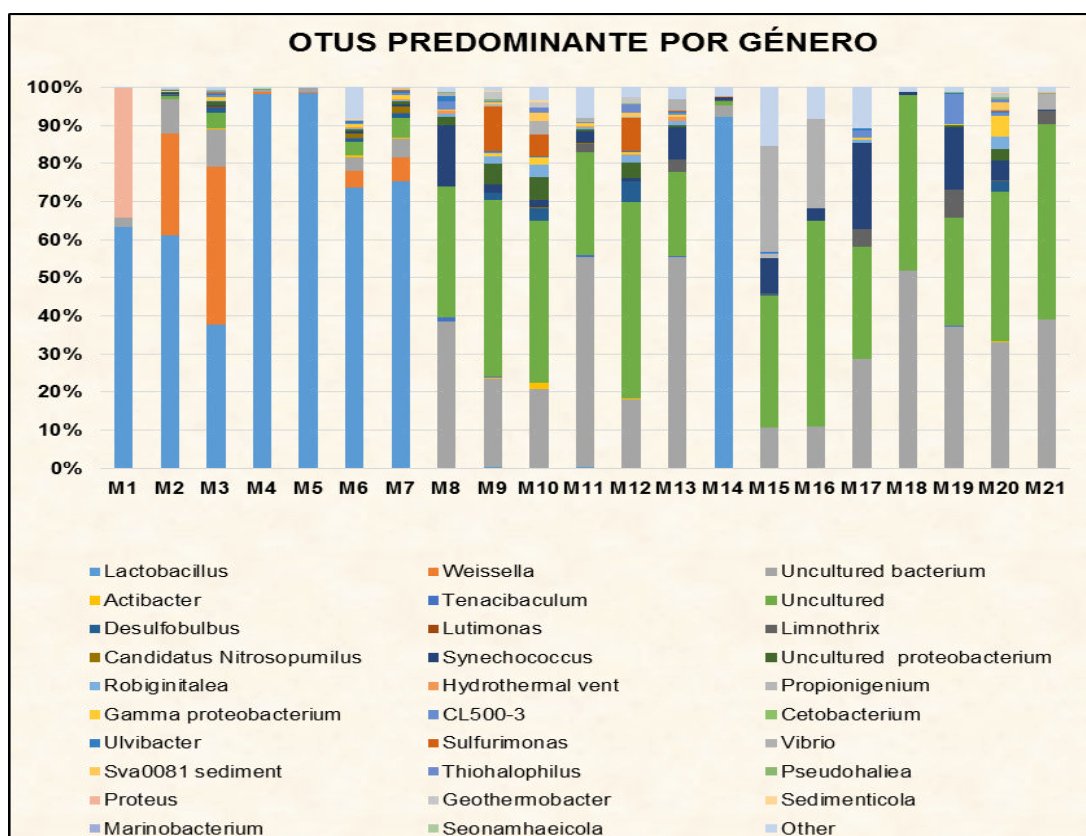
**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.



#### 4.1.6.5. OTUs predominantes en el nivel taxonómico de Género.

Para este nivel taxonómico que comprende 548 secuenciaciones las Unidades Taxonómicas Operacionales analizadas determinan evidencian que el género predominante es el *Lactobacillus* con un porcentaje en referencia a las 21 muestras secuenciadas del 27,61 %; *Uncultured bacterium* 20,08 %; *Weissella* 3,79; *Vibrio* 1,56; *Sulfurimonas* 0,57; 46,39 comprenden otros géneros (ver Gráfico 11), (ver Cuadro 10).

**Gráfico 15.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Género en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación.



**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

**Cuadro 11.** OTUs predominantes por Género en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo de camarón blanco.

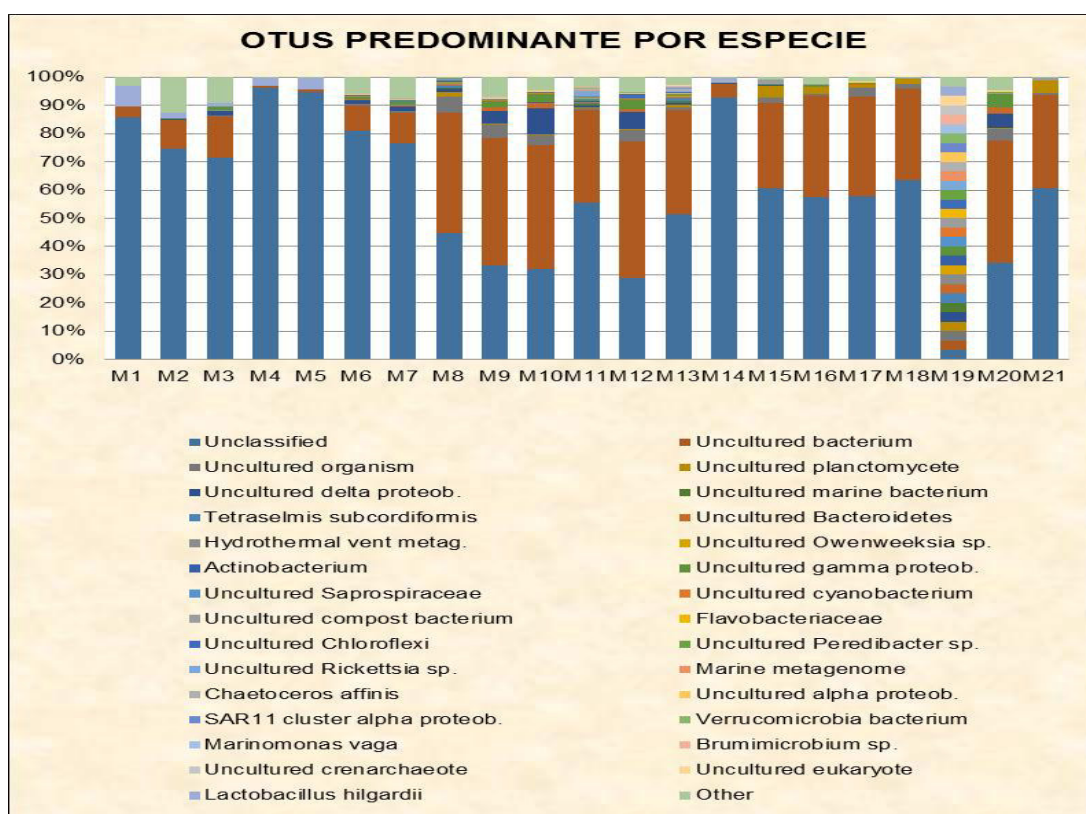
OTUS PREDOMINANTE POR GÉNERO																					
# OTUS IDENTIFICADOS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
Lactobacillus	0,5613	0,6060	0,3586	0,9819	0,9850	0,7342	0,6776	0,0006	0,0010	0,0005	0,0008	0,0005	0,0005	0,8905	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000
Weissella	0,0000	0,2619	0,3936	0,0044	0,0026	0,0436	0,0566	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Uncultured bacterium	0,0233	0,0893	0,0931	0,0075	0,0102	0,0377	0,0449	0,1910	0,0931	0,1054	0,1741	0,0816	0,2093	0,0300	0,0626	0,0464	0,1448	0,1648	0,1580	0,1625	0,1200
Actibacter	0,0000	0,0004	0,0037	0,0000	0,0000	0,0029	0,0030	0,0000	0,0016	0,0084	0,0002	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000
Tenacibaculum	0,0000	0,0002	0,0002	0,0000	0,0000	0,0004	0,0003	0,0053	0,0004	0,0006	0,0014	0,0001	0,0003	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0001	0,0000
Uncultured	0,0000	0,0082	0,0394	0,0011	0,0001	0,0360	0,0453	0,1720	0,1860	0,2190	0,0847	0,2370	0,0839	0,0111	0,2070	0,2310	0,1500	0,1460	0,1210	0,1930	0,1580
Desulfobulbus	0,0000	0,0024	0,0125	0,0000	0,0000	0,0078	0,0097	0,0000	0,0076	0,0156	0,0001	0,0246	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0128	0,0000
Lutimonas	0,0000	0,0003	0,0018	0,0000	0,0000	0,0014	0,0013	0,0000	0,0001	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Limnithrix	0,0000	0,0021	0,0006	0,0000	0,0000	0,0007	0,0011	0,0006	0,0000	0,0006	0,0074	0,0001	0,0124	0,0003	0,0031	0,0000	0,0225	0,0003	0,0310	0,0013	0,0113
Candidatus Nitrosopumilu	0,0000	0,0019	0,0004	0,0000	0,0000	0,0115	0,0148	0,0000	0,0006	0,0007	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000
Synechococcus	0,0000	0,0019	0,0016	0,0000	0,0000	0,0060	0,0056	0,0795	0,0088	0,0097	0,0102	0,0031	0,0324	0,0098	0,0540	0,0140	0,1156	0,0025	0,0697	0,0252	0,0002
Uncultured proteobacteriu	0,0000	0,0015	0,0095	0,0000	0,0000	0,0057	0,0070	0,0112	0,0210	0,0309	0,0009	0,0189	0,0022	0,0003	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0148	0,0000
Robiginitalea	0,0000	0,0004	0,0011	0,0000	0,0000	0,0040	0,0032	0,0042	0,0080	0,0165	0,0019	0,0096	0,0039	0,0002	0,0004	0,0000	0,0041	0,0000	0,0006	0,0163	0,0000
Hydrothermal vent	0,0000	0,0002	0,0010	0,0000	0,0000	0,0008	0,0014	0,0037	0,0001	0,0006	0,0009	0,0003	0,0041	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000
Propionigenium	0,0000	0,0012	0,0014	0,0000	0,0000	0,0013	0,0020	0,0000	0,0001	0,0003	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0062	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000
Gamma proteobacterium	0,0000	0,0014	0,0084	0,0000	0,0000	0,0063	0,0082	0,0017	0,0038	0,0088	0,0025	0,0025	0,0017	0,0005	0,0003	0,0000	0,0028	0,0000	0,0004	0,0258	0,0000
CL500-3	0,0000	0,0010	0,0045	0,0000	0,0000	0,0052	0,0058	0,0104	0,0006	0,0008	0,0009	0,0006	0,0024	0,0006	0,0020	0,0000	0,0098	0,0000	0,0341	0,0049	0,0000
Cetobacterium	0,0000	0,0007	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Ulvibacter	0,0000	0,0007	0,0029	0,0000	0,0000	0,0038	0,0047	0,0069	0,0007	0,0016	0,0005	0,0009	0,0012	0,0002	0,0011	0,0000	0,0023	0,0000	0,0010	0,0015	0,0000
Sulfurimonas	0,0000	0,0002	0,0003	0,0000	0,0000	0,0012	0,0014	0,0001	0,0480	0,0284	0,0002	0,0393	0,0002	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000
Vibrio	0,0000	0,0006	0,0011	0,0001	0,0000	0,0008	0,0013	0,0049	0,0021	0,0190	0,0028	0,0022	0,0115	0,0003	0,1655	0,1010	0,0001	0,0000	0,0002	0,0013	0,0133
Sva0081 sediment	0,0000	0,0003	0,0014	0,0000	0,0000	0,0013	0,0021	0,0000	0,0020	0,0108	0,0000	0,0051	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0099	0,0000
Thiohalophilus	0,0000	0,0006	0,0025	0,0000	0,0000	0,0002	0,0004	0,0000	0,0011	0,0067	0,0000	0,0094	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0036	0,0000
Pseudohalaea	0,0000	0,0002	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0006	0,0014	0,0011	0,0000	0,0006	0,0002	0,0001	0,0001	0,0000	0,0006	0,0000	0,0006	0,0020	0,0002
Proteus	0,3027	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013
Geothermobacter	0,0000	0,0002	0,0010	0,0000	0,0000	0,0006	0,0007	0,0000	0,0078	0,0064	0,0000	0,0076	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0060	0,0000
Sedimenticola	0,0000	0,0002	0,0008	0,0000	0,0000	0,0005	0,0007	0,0000	0,0013	0,0032	0,0001	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0000
Marinobacterium	0,0000	0,0004	0,0006	0,0000	0,0000	0,0005	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Seonamhaecicola	0,0000	0,0002	0,0020	0,0000	0,0000	0,0005	0,0006	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000
Other	0,0011	0,0047	0,0055	0,0050	0,0021	0,0834	0,0010	0,0065	0,0041	0,0169	0,0250	0,0120	0,0119	0,0217	0,0910	0,0352	0,0540	0,0041	0,0058	0,0056	0,0036

**Fuente:** Tesis Doctoral 2016. .

#### 4.1.6.6. OTUs predominantes en el nivel taxonómico de Especie.

Es el nivel más abundante en la secuenciación metagenómica comprende 1.780 secuenciaciones. La especie de mayor impacto corresponde al porcentaje 61,22% asignado a la especie Unclassified; 26,40 % Uncultured bacterium; 1,33 Uncultured organismo; 0,82 Lactobacillus; Uncultured bacteroide 0,66% y 9,57 asignado para otras especies asociadas. (Ver gráfico 16).

**Gráfico 16.** OTUs predominantes en el nivel taxonómico Especie en la microbiota utilizada para la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco en todas sus fases de experimentación.



**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

**Cuadro 12.** OTUs predominantes por Especie en la microbiota utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo de camarón blanco.

OTUS PREDOMINANTE POR ESPECIE																					
# OTUS IDENTIFICADOS	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
Unclassified	81047	54136	31254	90246	72488	19180	18627	17730	5833	12435	21300	17094	35408	72877	27335	18350	19690	41464	21954	5406	12669
Uncultured bacterium	3654	7446	6460	806	793	2114	2642	17025	7921	16944	12494	28704	25546	3690	13595	11419	12122	21180	21954	6876	6910
Uncultured organism	1	48	128	0	0	139	113	2193	808	1367	230	2494	618	148	819	272	1091	1158	21954	661	160
Uncultured planctomycete	0	5	6	0	0	9	11	647	76	162	133	246	722	8	1882	786	263	1199	21954	35	881
Uncultured delta proteob.	0	174	646	0	0	272	354	464	766	3558	239	3456	500	26	87	13	45	0	21954	833	0
Uncultured marine bacterium	0	3	3	0	0	2	6	250	3	15	235	5	476	143	0	0	12	0	21954	3	0
Tetraselmis subcordiformis	0	0	0	0	0	0	0	222	2	1	219	3	472	5	0	0	0	0	21954	0	0
Uncultured Bacteroidetes	0	35	101	0	0	100	121	158	225	719	78	698	308	42	0	0	25	0	21954	334	0
Hydrothermal vent metag.	0	12	43	0	0	18	33	146	2	24	35	18	285	35	0	0	0	0	21954	3	0
Uncultured Ow enw eeksia sp.	0	0	0	0	0	0	1	130	14	17	17	5	79	5	0	0	0	0	21954	0	0
Actinobacterium	0	1	3	0	0	0	1	124	0	4	63	1	151	14	1	0	29	22	21954	0	2
Uncultured gamma proteob.	0	169	548	0	0	226	297	122	406	1151	303	2055	245	51	112	183	138	0	21954	770	0
Uncultured Saprospiraceae	0	0	0	0	0	0	0	120	0	0	26	0	57	2	0	0	0	0	21954	0	0
Uncultured cyanobacterium	0	0	0	0	0	6	3	112	20	88	23	38	102	22	14	0	14	0	21954	17	0
Uncultured compost bacterium	0	0	0	0	0	0	1	39	0	3	0	0	9	0	715	59	21	200	21954	6	213
Flavobacteriaceae	0	1	7	0	0	4	4	36	3	4	121	15	217	15	3	0	33	0	21954	26	0
Uncultured Chloroflexi	0	8	23	0	0	103	122	32	52	155	90	1000	215	22	0	0	0	0	21954	21	0
Uncultured Peredibacter sp.	0	1	2	0	0	0	1	32	2	11	2	5	0	1	0	0	0	0	21954	2	0
Uncultured Rickettsia sp.	0	1	0	0	0	1	1	32	1	5	831	14	101	60	0	0	67	0	21954	2	0
Marine metagenome	0	0	0	0	0	0	0	28	0	7	34	1	90	12	5	0	0	0	21954	0	0
Chaetoceros affinis	0	1	0	0	0	0	0	21	0	16	274	37	710	114	0	0	0	0	21954	10	0
Uncultured alpha proteob.	0	1	3	0	0	21	44	17	104	162	9	207	26	2	20	0	0	36	21954	38	0
SAR11 cluster alpha proteob.	0	1	1	0	0	1	0	10	0	2	39	0	79	22	0	0	0	0	21954	0	0
Verrucomicrobia bacterium	0	7	18	0	0	12	17	5	10	25	30	67	12	19	0	0	0	0	21954	4	0
Marinomonas vaga	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	296	0	0	0	0	0	21954	0	0
Brumimicrobium sp.	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	125	1	245	7	0	0	0	0	21954	0	0
Uncultured crenarchaeote	0	0	0	0	0	3	4	2	91	60	0	98	0	0	0	0	0	0	21954	43	0
Uncultured eukaryote	0	1	2	0	0	10	11	2	1	22	27	30	118	13	0	0	48	0	21954	37	0
Lactobacillus hilgardii	6975	1526	563	2567	3274	36	22	1	0	1	1	1	3	981	0	0	0	0	21954	0	0
Other	2764	9045	3987	195	99	1392	1861	6	1176	1744	1301	3071	1914	155	390	813	514	48	21954	726	43

**Fuente:** Tesis Doctoral 2016.

## 4.2. Contrastación de la Hipótesis

La contrastación de Hipótesis o prueba de significación es un procedimiento que permite juzgar si una propiedad que se supone en una población estadística es compatible con lo observado en una muestra de la dicha población. (J. Neyman. K. Pearson).

Esta teoría determina estadísticamente si una hipótesis determinada o nula ( $H_0$ ), que debe rechazarse o aceptarse. Además se requiere una hipótesis alternativa ( $H_1$ ).

La contrastación de la Hipótesis exige, en primera instancia, verificar la normalidad de los datos obtenidos para los parámetros nitrogenados tóxicos en la en la piscina de producción del camarón blanco aplicando la prueba de Shapiro-Wilk. La verificación de la Hipótesis se realiza a través de la prueba de t Student para cada uno de los parámetros.

### 4.2.1. *Verificación de normalidad*

$H_0$ : la variable es normal.

$H_1$ : la variable no es normal.

Con un nivel de confianza de 95% se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk ( $n < 30$ ) y se obtuvieron los resultados:

Parámetros	Shapiro – Wilk		
	Estadístico	gl	Valor p
Amonio	0,671	12	0,054
Nitritos	0,724	12	0,061
Nitratos	0,778	12	0,075

En los tres casos, el valor p es mayor que 0,05. Por lo tanto, se deduce que no es posible rechazar  $H_0$ , queda entonces vigente el hecho de la normalidad de las variables indicadas.

#### 4.2.2. Verificación de hipótesis

Se trata de probar el efecto biorremediador de la microbiota autóctona del mangle rojo sobre los parámetros tóxicos, como son el amonio, los nitritos y los nitratos. Para ello se toma como referencia los valores permisibles para cada uno de ellos: amonio ( $<0,1$ ); nitritos ( $<0,23$ ) y nitratos ( $<0,2$ ).

Para el amonio:

$H_0$ : promedio = 0,10

$H_1$ : promedio  $< 0,10$

Estadísticos:

Amonio	Estadísticas de muestra única			
	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
	12	0,0825	0,09706	0,02802

Valor de prueba = 0,10					95 % de intervalo de confianza de la diferencia	
Amonio	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencias de medias	Inferior	Superior
	-0,625	11	0,045	-0,01750	-0,0792	0,0442

El valor p obtenido para la prueba t de Student del amonio es de 0,045, con lo cual se rechaza  $H_0$ . Se acepta que la disminución del nivel de toxicidad del amonio es significativa.

Para los nitritos:

$H_0$ : promedio = 0,23

$H_1$ : promedio < 0,23

Estadísticos:

Estadísticas de muestra única				
Nitritos	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
	12	0,1050	0,13365	0,03858

**Prueba de inferencia:**

Valor de prueba = 0,23					95 % de intervalo de confianza de la diferencia	
Nitritos	T	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencias de medias	Inferior	Superior
	-3,240	11	0,008	-0,12500	-0,2099	-0,0401

El valor p obtenido para la prueba t de Student de una muestra es de 0,008, con el cual se rechaza  $H_0$ . Se acepta que la disminución del nivel de toxicidad de los nitritos es significativa.

Para los nitratos:

$H_0$ : promedio = 0,20

$H_1$ : promedio < 0,20

Estadísticas de muestra única				
Nitratos	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
	12	0,1442	0,17987	0,05192

Prueba de inferencia.

Valor de prueba = 0,2					95 % de intervalo de confianza de la diferencia	
Nitratos	t	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencias de medias	Inferior	Superior
	-1,075	11	0,035	-0,05583	-0,1701	0,0585

El valor p obtenido para la prueba t de Student de una muestra es de 0,035, con el cual se rechaza  $H_0$ . Se acepta, entonces, que la disminución del nivel de toxicidad de los nitratos es significativa.



### 4.3. Discusión

La presentación de los resultados se fundamenta en la relación científica y técnica con investigaciones relacionadas y la aplicación de técnicas verdes de biorremediación del agua recirculante en la producción del camarón blanco con la finalidad de mantener una calidad óptima que garanticen la producción y la salud del crustáceo, así como la preservación del medio ecológico.

#### 4.3.1. *Impacto de los residuos nitrogenados tóxicos*

Conforme el monitoreo de parámetros tóxicos se evidencio que los niveles de amonio, nitritos, nitratos son afectados en su concentración, específicamente en el canal recolector, sedimentador y reservorio, como producto de la actividad metabólica de los microorganismos y la materia orgánica, proceso bioquímico que consume oxígeno por lo que su concentración no garantiza la vida de las especies acuícolas. (Cuadro 1).

Esta situación fue expuesta en investigaciones realizadas por Ruby Montoya en el año 2.000, titulada **“El papel de las bacterias en las estrategias de alimentación y manejo en sistemas acuícolas”**, donde se menciona la importancia en conocer la dinamica del nitrógeno y sus metabolitos que conllevan graves riesgos a la producción y salud animal. Igual diagnóstico refiere Michelle A. Burford, Kevin C. Williams, del Centro de Investigación Marina para la Acuicultura, Australia, en el año 2000, en sus estudios **“Destino de los desechos nitrogenados de la alimentación del camarón”**, donde se expone la problemática del nitrógeno soluble proveniente de la alimentación, excreción de las especies bioacuáticas,

lixiviación de alimentos formulados y heces del camarón. En estos estudios se cuantificó altas concentraciones de nitrógeno disuelto en el sedimento, en residuos del camarón y en las heces fecales en forma de urea, afectando notablemente la calidad del agua acuícola.

#### **4.3.2. Biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón**

Conforme demuestran los resultados la biorremediación del agua con microbiota del mangle rojo en cultivos del camarón blanco mejora notablemente la calidad del agua manteniendo niveles óptimos para la producción acuícola. (Ver Cuadro 2). Los resultados obtenidos se relaciona con los estudios de **Biorremediación in situ de efluentes de cultivo de camarón utilizando tapetes microbianos**, publicados por los investigadores J. Paniagua, J. Michel, O. García, del Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Tijuana-México. 2002, donde se evidencia la eficiencia de la Biorremediación microbiana al disminuir los niveles del nitrógeno amoniacal en el 96% en tratamiento de 20 días. Similares resultados se presentaron en estudios publicados en Naga-India, por el Centro Mundial de Pesca en el 2006, por lo investigadores Antonio y R. Philip, con la temática titulada “**Biorremediación en sistemas de cultivo de camarón**”, con énfasis en la utilización de bacterias indígenas y consorcios bacterianos de géneros nitrosomas, pseudomonas, bacterias desnitrificantes, fotosintéticas, entre otras especies. Mendoza O. 2009, en su investigación realizada en La Universidad de Tumbes, publicó su trabajo de tesis titulado “**Utilización de bacteria nitrificantes como biorremediadores del agua de cultivo de Litopenaeus vannamei en Tumbes – Perú**”, concluyó que los mejores tratamientos de biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco se obtiene con bacterias nitrificantes del género Nitrosomas y Nitrobacter, lo que se relaciona con la

biodiversidad microbiana presente en la microbiota utilizada en la biorremediación en esta investigación.

#### **4.3.3. Asociación de comunidades bacterianas en la producción acuícola.**

Diversos estudios determinan que la asociación de comunidades bacterianas tiene un alto impacto positivo en la producción acuícola debido a la interacción de las bacterias con los metabolitos procedentes de la nutrición acuícola y los compuestos residuales presentes en el agua y sedimento de la piscina de producción del camarón. La presente investigación está ligada a la dinámica de la asociación bacteriana al utilizar la microbiota bioaumentada que mantiene una elevada biodiversidad como se demuestra en el Cuadro 5. Estos resultados de biodiversidad se relacionan con lo planteado por el grupo de investigación de la Universidad de Australia, en la publicación titulada “**Biota asociada a las raíces del mangle rojo (Rhizophora mangle) en la Bahía de Cispatá y la Ciénaga La Caimanera, Caribe Colombiano**”. 1977, donde se evidencia la actividad de la biota extraída del mangle rojo como alternativa para mantener un control de los niveles de parámetros básicos y tóxicos en el agua de los cultivos de camarón blanco. De igual forma estudios realizados por investigadores de la Universidad de Louisiana acerca del **Uso potencial de los manglares como fuente de nitrógeno en acuicultura en efluentes de los estanques de camarón**, determinan la actividad del nitrógeno en los procesos de nitrificación y desnitrificación asociada a biodiversidad de la biota.

#### **4.3.4. Biodiversidad metagenómica de la microbiota**

La secuenciación metagenómica determino que el nivel taxonómico especie es el más abundante con 1.780 secuenciaciones. La especie de mayor

impacto es la Unclassified con el 61,22%, Uncultured bacterium 26,40 %, Uncultured organismo 1,33%, Lactobacilos 0,82, Uncultured bacterioide 0,66%, que representan en conjunto el 90,43% y 9,57% asignado para otras especies asociadas. Ghosh A, et al, en su investigación **“Análisis molecular independiente de la cultura de comunidades bacterianas en los sedimentos de manglar de Sundarban-India”**, el análisis filogenético de genes reveló la diversidad de cepas bacterianas en el sedimento donde se detectó Proteobacterias, Flexibacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, y Planctomycet. Otros estudios basados en técnicas metagenómicas identificaron diversidad de familias, géneros y especies de bacterias, arqueas, viridiplantae, protozoario y fungís. Se concluyó que la evolución de la microbiota por factores intrínsecos incrementa notablemente la biodiversidad de acuerdo al índice de diversidad de Simpson y de Shannon Mendoza O., 2014

#### ***4.3.5. Relación de la biodiversidad bacteriana identificada y los parámetros fisicoquímicos monitoreados***

El 90.43% de los OTUs de mayor diversidad microbiana corresponde a cinco especies y de ellas el 87,62%, son Unclassified y Uncultured bacterium clasificadas en este ámbito debido a que no se conoce con especificidad su nomenclatura microbiana, el 2.81% le corresponde a especies bien definidas como Lactobacilos y Uncultured bacterium. Esta biodiversidad casi desconocida ejerce una potencial actividad biorremediadora de la calidad de agua acuícola en el cultivo del camarón blanco manteniendo niveles óptimos de calidad en los parámetros básicos monitoreados y específicamente en los compuestos tóxicos como amonio, nitritos y nitratos, que afectan la calidad del agua, la salud del crustáceo y el medio ambiente.

## CONCLUSIONES

Conforme los resultados obtenidos en la investigación, se concluye:

1. La microbiota autóctona extraída del mangle rojo del ecosistema del río Chaguana, bioaumentada con fuentes energéticas y nutritivas estimula eficazmente la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco, manteniendo los niveles de compuestos nitrogenados tóxicos en concentraciones mínimas y estables.
2. La biodiversidad de la microbiota autóctona y bioaumentada utilizada en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco, es la que al interactúa en el proceso biorremediador a través de las Unidades Taxonómicas Operacionales, a nivel de los compuestos nitrogenados tóxicos.
3. La cuantificación de parámetros nitrogenados que afectan la calidad del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco garantiza la eficiencia de la biorremediación a través del monitoreo de los mismos.
4. El uso de la microbiota en la biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco depende de la concentración de los niveles de los compuesto nitrogenados tóxicos del sedimento, del agua, de los constituyentes de los alimentos empleados en la nutrición del crustáceo y de la densidad de la siembra.
5. El monitoreo de parámetros básicos y nitrogenados, en la biorremediación del agua en el cultivo del camarón blanco utilizando garantiza su calidad y por ende la salud animal, la producción y preserva el ecosistema.

## RECOMENDACIONES

1. Desarrollar procesos de biorremediación del agua recirculante en el cultivo del camarón blanco utilizando microbiota bioaumentada propia del ecosistema donde se desarrolla la producción.
2. Conocer las características metagenómicas de la microbiota autóctona y bioaumentada en función de la zona extraída.
3. Aplicar técnicas de monitoreo y control de parámetros básicos y compuestos nitrogenados tóxicos utilizando procedimientos electrométricos in situ por brindar lecturas inmediatas y seguras.
4. Utilizar proceso de biorremediación verdes que garantizan la calidad del agua, la salud animal, la producción y el ecosistema.
5. Desarrollar investigaciones en el ámbito acuícola utilizando técnicas metagenómicas que garantiza en el 99% de la biodiversidad microbiana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alemán, Diego y Elmo Yaranga. Efecto de tres dosis de bacterias probióticas sobre la supervivencia de *Penaeus vannamei* en cultivo semi intensivo. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero. Facultad de Ingeniería Pesquera, Universidad Nacional de Tumbes. 2000.
2. Aakra, Å., J. Utåker y I. Nes. 2001. Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 205: 237-242. 2001
3. Andreotti, R., A. A. Pérez de León, S. E. Dowd, F. D. Guerrero, K. G. Bendele y G. A. Scoles. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC BioMed Central Ltd.* 201
4. Antony, S. y R.Philip. Bioremediation in Shrimp Culture Systems. *NAGA, World Fish Center Quarterly.* 2006.
5. Azim, M. E., A. Milstein, M. A. Wahab, y M. C. J. Verdegam. 2003. Periphyton-water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates. *Aquaculture*, 2003.
6. Balcázar, José. 2002. "Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales." Facultad de Acuicultura, Universidad de Machala (Ecuador). Congreso Internacional Virtual de Acuicultura.
7. Baia, Y., J. Liang, R. Liu, Ch. Hua, J. Qu. 2014. Metagenomic analysis reveals microbial diversity and function in the rhizosphere soil of a constructed wetland. *Environmental.*
8. Benavides et al., 2006, Raiger y López 2009). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediación,. <http://www.redalyc.org/pdf/863/86347589005.pdf>.
9. Barón-Sevilla, B., L. Bückle-Ramírez y M. Hernández-Rodríguez. Intensive Culture of *Litopenaeus vannamei*, in a recirculating seawater system. *Ciencias Marinas/vol. 30, número 01B.* Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México. 2004.

10. Bender, J. y Phillips, P. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresource Technology*, 2004.
11. Bernhard, A., Z. Landry, A. Blevins, J. De la Torre, A. Giblin y D. Stahl.
12. Buschmann, A. 2001. Un análisis bibliográfico de los avances y restricciones para una producción sustentable en los sistemas acuáticos. Departamento de Acuicultura, Universidad de Los Lagos, Osorno, Chile.
13. Boyd, C. E. and D. Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria along an Estuarine Salinity Gradient in Relation to Potential Nitrification Rates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010.
14. Bothe, H., G. Jost, M. Schlöter, B. Ward y Karl-Paul Witzel. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000.
15. Brehm-Stecher B. F. y E. A. Johnson. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol Mol Biol*. 2004.
16. Brown, M. V., G. K. Phili, J. A. Bunge, M. C, Smith, A. Bissett, F. M. Lauro, J. A. Fuhrman y S. P. Donachie. 2009. Microbial community structure in the North, *International Society for Microbial Ecology*. *ISME J* 3:1374–1386
17. Boyd C. E. and A. Gross. Use of probiotics for improving soil and water quality in aquaculture ponds. T. W. Flegel. *Advances in Shrimp Biotechnology*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand. 1998. .
18. Boyd, C. E. and C. S. Tucker. *Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture*. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA. 1992.
19. Boyd, C. E., J. Queiroz, J. Lee, M. Rowan, G. N. Whitis and A. Gross. Environmental assessment of channel catfish *Ictalurus punctatus* farming in Alabama. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2000.
20. Bravo, M. Análisis de la cobertura de manglares, camaroneras y salinas en el Ecuador. *Serie Documentos de Trabajo PMRC*. 1999.
21. Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves



- diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(1), 57-59.
22. Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample.
  23. Carvajal, R. El manglar en el Ecuador. Fundación Natura. Capitulo Guayaquil, Guayaquil – Ecuador. 2001.
  24. Centro de Energía Nuclear en Agricultura de la Universidad de Sao Paulo, el CENA/USP, Piracicaba-Brasil, Departamento de Microbiología Paulo de Góes, Universidad de Río de Janeiro-Brasil, Servicio de Ecología Microbiana, Centro de Estudios de la Evolución Ecológica y (CEES), Universidad de Groningen, “La abundancia y la diversidad genética de las secuencias de genes nifH, en 2 sedimentos de manglar brasileños afectados por factores antropogénicos”. 2010.
  25. Citron, M. et al. Métodos para la descripción y estudios de áreas de manglar. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil – Ecuador. 1984.
  26. Clynn, H. y Heinke, G. Ingeniería Ambiental. Segunda Edición. Editorial Prentice Hall. Ciudad México. 1999.
  27. “Cultivo de *litopenaeus vannamei* en un sistema con agua de mar recirculada, como alternativa a los cultivos semi-intensivos tradicionales”. Ricardo Ernesto Anaya Rosas\* y Luis Fernando Bückle Ramírez. Universidad Estatal de Sonora- México. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
  28. Cleoceri, L. S., A. E. Greenburg and A. D. Eaton. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Association, Washington, D.C., USA. 1998.
  29. Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer, y R. Knight. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. 2011.

30. Cottrell, M. T., L. A. Waidner, L. Yu y D. L. Kirchman.. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environmental Microbiology*, 2005.
31. Crab, R., Y. Avnimelech, T. Defoirdt, P. Bossier y W. Verstraete. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 2007.
32. Congreso Nacional del Ecuador. Comisión de Legislación y Codificación. Codificación 2004-019. Ley de Gestión Ambiental. Quito-Ecuador. 2004.
33. Charuvaka, A. y H. Rangwala. Evaluation of short read metagenomic assembly. *BMC Genomics*. 2011.
34. Dacho, N. y S. Mustafa. Effluent and disease management in traditional practices of shrimp farming: A case study on the west coast of Sabah, Malaysia. Borneo Marine Research Institute, University Malaysia Sabah, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 2009
35. Delmont, T. O., E. Prestat, K. P. Keegan, M. Faubladier, P. Robe, I. M. Clark, E. Pelletier, P. R. Hirsch, F. Meyer, J. A. Gilbert, D. L. Paslier, P. Simonet y T. M. Vogel. . Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *International Society for Microbial Ecology*. 2012.
36. De Santis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, y G. L. Andersen, Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006.
37. Donovan, D. Environmental code of practice for Australian prawn farmers. Kuruma, Australia Pty. Ltd., East Brisbane, Australia. 1997.
38. De Roberts – Ponzio, *Biológia Celular y Molecular*. Editorial Ateneo, Buenos Aires. Argentina, 1997.
39. David J. W. Moriarty David J. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. *Microbial Interactions in Aquaculture. Biomanagement Systems Pty. Ltd.*, 315 Main Road, Wellington Point. Queensland 4160 Australia, and Department of Chemical Engineering, The University of Queensland. Qld. 4072 Australia. 1999.

40. E. Gilbert, Jack Anthony. Schuster, S. C. (2007). «Next-generation sequencing transforms today's biology». *Nature Methods*. 2010.
41. Edwards, RA; Rodriguez-Brito B; Wegley L; Haynes M; Breitbart M; Peterson DM; Saar MO; Alexander S; Alexander EC; Rohwer. *Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology*. 2006.
42. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). *Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2010*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma, 2010.
43. Féray, C., B. Volat, V. Degrange, A. Clays-Josserand y B. Montuelle. *Assessment of Three Methods for Detection and Quantification of Nitrite-Oxidizing Bacteria and Nitrobacter in Freshwater Sediments (MPN-PCR, MPN-Griess, Immuno fluorescence. Microb Ecol* .1999.
44. George I. *Application of Metagenomics to Bioremediation. Metagenomics: Theory, Methods and Applications*. Caister Academic Press. 2011
45. Glazer y Nikaido, 1995, *Biorremediación de suelos, agua, en minas*, <[zhhttp://ingenierosdeminas.org/documentos/fundamentos\\_%20biorremediacion.pdf](http://ingenierosdeminas.org/documentos/fundamentos_%20biorremediacion.pdf)>.
46. Ghosh A, N. Dey, A. Bera, A. Tiwari, K. Sathyaniranjana, K. Chakrabarti, D. Chattopadhyay. "Análisis molecular independiente de la cultura de comunidades bacterianas en los sedimentos de manglar de Sundarban-India". 2005.
47. Gli, K., Ch. Langer, S. Hans-Ruedi, A. Zehnder, M. Wagner y J. van Der Meer. *Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-Up of Nitrification Reactors. Applied and Environmental Microbiology*. 2003.
48. Gautier. *Effluent composition and water quality standards. Global Aquaculture Advocate*. 2000.
49. Hernandez-Leon R, I Velazquez-Sepulveda, MC Orozco-Mosqueda, G Santoyo. *Metagenómica de suelos: Grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. Revista Internacional de Botánica experimental International Journal of experimental Botany*, 2010.
50. Huang, J. P., A. K. Swain, R. W. Thacker, R. Ravindra, D. T. Andersen, y A. K. Bej. 2013. *Bacterial diversity of the rock-water interface in an East Antarctic freshwater ecosystem, Lake Tawani. Aquatic Biosystems* 2013.

51. Identificación de especies bacterianas en el sistema radicular de *Rhizophora mangle*, en el Santuario Nacional. Los Manglares de Tumbes, 2012. <http://consideracionesacuicolas2.webnode.com.co/news/parametrosfisico/qui>.
52. Jiann-Chu Chen. Manejo de desechos nitrogenados de ambientes acuícolas. Department of Aquaculture National Taiwan Ocean University. En Sánchez, D. y C. Ching. 2003. [www.nicovita.com.pe](http://www.nicovita.com.pe)
53. J Gregory Caporaso, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D Bushman, Elizabeth K Costello, Noah Fierer, Antonio Gonzalez Pena, Julia K Goodrich, Jeffrey I Gordon, Gavin A Huttley, Scott T Kelley, Dan Knights, Jeremy E Koenig, Ruth E Ley, Catherine A Lozupone, Daniel McDonald, Brian D Muegge, Meg Pirrung, Jens Reeder, Joel R Sevinsky, Peter J Turnbaugh, William A Walters, Jeremy Widmann, Tanya Yatsunenko, Jesse Zaneveld and Rob Knight; *Nature Methods*, 2010; doi:10.1038/nmeth.f.303.
54. Khatoon, H., F. Yusoff, S. Banerjee, M. Shariff y S. Mohamed. Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture*. 2007.
55. Kerlinger F., Lee H. Investigación del Comportamiento. Universidad del Estado de California. Editorial Mc-Graw-Hill. Cuarta edición. 2002.
56. Kowalchuk G. y J. Stephen. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001.
57. Lezama-Cervantes, C., J. Paniagua-Michel y J. Zamora-Castro. Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Lat. Am. J. Aquat.* 2010.
58. Mendoza, O. 2009. Evaluación de la comunidad microbiana del proceso de nitrificación en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*, Tumbes. Universidad. Nacional. de Tumbes-Perú.
59. Mendoza O, "Genómica estructural de la microbiota de los efluentes del cultivo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) Tumbes-Perú", 2014.

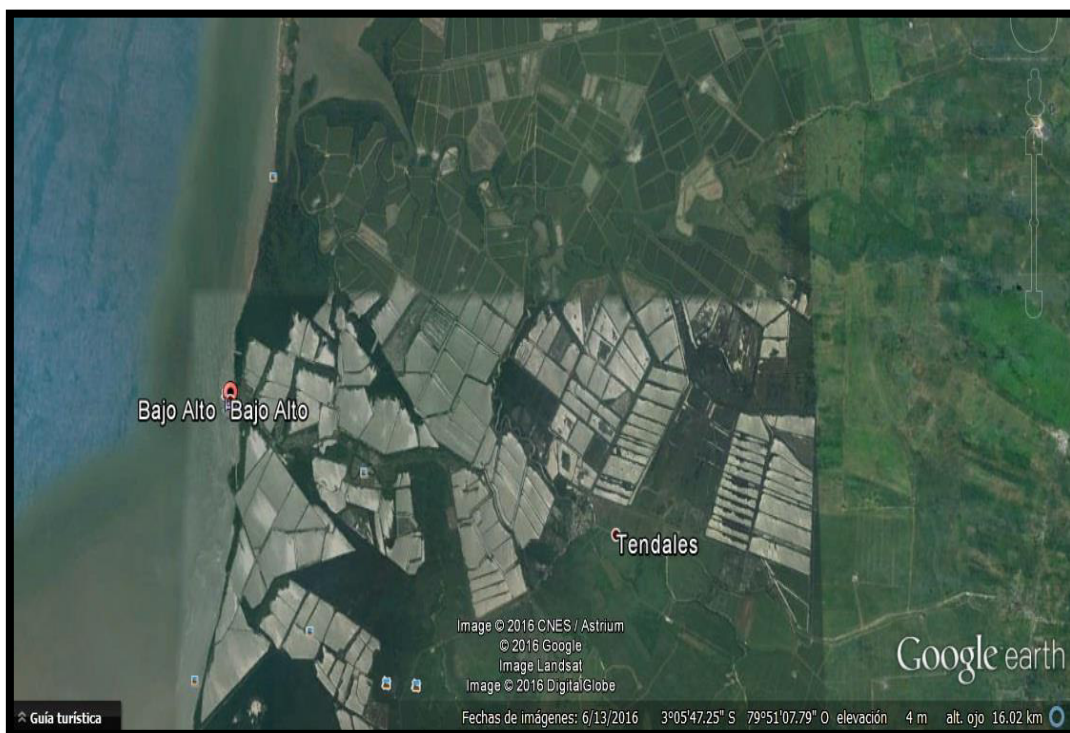
60. Marlon Córdoba, Claudia Arango, Raúl Sarabia y Oscar D. Solano. James Cook University, Australia. "Biota asociada a las raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle*) en la Bahía de Cispatá y la Ciénaga La Caimanera, Caribe Colombiano". 1977
61. Mitra, S., M. Stärk, y D. H. Huson. 2011. Analysis of 16S rRNA environmental sequences using MEGAN. Bio. Med. Central. Center for Bioinformatics ZBIT, Tübingen University, Germany. 2011.
62. Manejo de estanques camaroneros: Balance de nitrógeno y fósforo en estanques de producción de camarón en Ecuador. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM. VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 2002.
63. Menéndez, L. 1994. Guanabacoa: Una propuesta de plan de manejo integrado de los Spiro, G. y Stigliani, M. 2004. Química Ambiental. Segunda Edición. Editorial Pearson Educación. Madrid - España.
64. Montoya R, (2000), "El papel de las bacterias en las estrategias de alimentación y manejo en sistemas acuícolas", Global Acuicultura ADVOCATE, Ecuador.
65. Michele A. Burford, Kevin C. Williams, 2000, Centro de Investigación Marina para la Acuicultura, Australia, "Destino de los desechos nitrogenados de la alimentación del camarón". .
66. Michele A. Burford a,b), Kevin C. Williams a,b. 2000. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding a CSIRO Marine Research, P.O. Box 120, Cleveland, Queensland 4163, Cooperative Research Centre for Aquaculture, Australia.
67. Marín R. Microbiología de los medios acuáticos, España, Editorial Díaz de Santos. 2003.
68. Nicola, Segata; Daniela Boernigen; Timothy L Tickle; Xochitl C Morgan; Wendy S Garrett; Curtis Huttenhower. Computational metaomics for microbial community studies». Molecular Systems Biology. 2013.
69. Paniagua J, J. Michel, O. García, Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Tijuana-México. 2002,

70. Páez-Osuna, F. The Environmental Impact of Shrimp Aquaculture: Causes, Effects, and Mitigating Alternatives. Environmental Management. 2001.
71. Pardo, S.; H. Suárez y E. Soriano. Tratamiento de efluentes: una vía para la acuicultura responsable. Revista MVZ Córdoba. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia. 2006.
72. Peng, Y. y G. Zhu. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006.
73. Peralta T, "Identificación de especies bacterianas en el sistema radicular de Rhizophora mangle, en el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes-Perú, 2012.
74. Poinar, HN; Schwarz, C; Qi, J; Shapiro, B; Macphee, RD; Buigues, B; Tikhonov, A; Huson, D; Tomsho, LP; Auch, A; Rampp, M; Miller, W; Schuster, SC .Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth. 2006.
75. Schloss, P. D. y J. Handelsman, A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. BMC Bioinformatics, BioMed Central Ltd. 2008.
76. Ravichandran and Jalaludin. Bioremediation in Shrimp Culture Systems, 2001. [http://pubs.iclarm.net/resource\\_centre/article9.pdf](http://pubs.iclarm.net/resource_centre/article9.pdf). 62, 64.
77. Ruíz-Rueda, O. Nitrifying and denitrifying bacterial communities in the sediment and rhizosphere of a free water surface constructed wetland. Tesis Doctoral. Universidad de Gerona – España. 2009.
78. Rodrigue, S. B.; Materna, A. C.; Timberlake, S. C.; Blackburn, M. C.; Malmstrom, R. R.; Alm, E. J.; Chisholm, S. W. Unlocking Short Read Sequencing for Metagenomic. 2010.
79. Tamayo M. El proceso de la investigación cinética. Editorial Limusa, 5ta edición, México 2012.
80. Tyson, GW; Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. Insights into community structure and metabolism by reconstruction of microbial genomes from the environment. 2004.

81. Queiroz, J. F. and C.E. Boyd. Evaluation of a kit for estimating organic matter concentrations in bottom soils of aquaculture ponds. Journal of the World Aquaculture Society. 1998.
82. Valderrama S. Pasos para elaborar proyectos de investigación científica, . Editorial San Marcos. Lima-Peru, 2002.
83. Víctor H, Rivera – Monroy, Departamento de Biología, Universidad de Louisiana-USA. Luis A Torres. Nixon Bahamon, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, Santa Marta – Colombia, Robert Twilley, Departamento de Biología, Universidad de Louisiana, EE.UU, 1999.

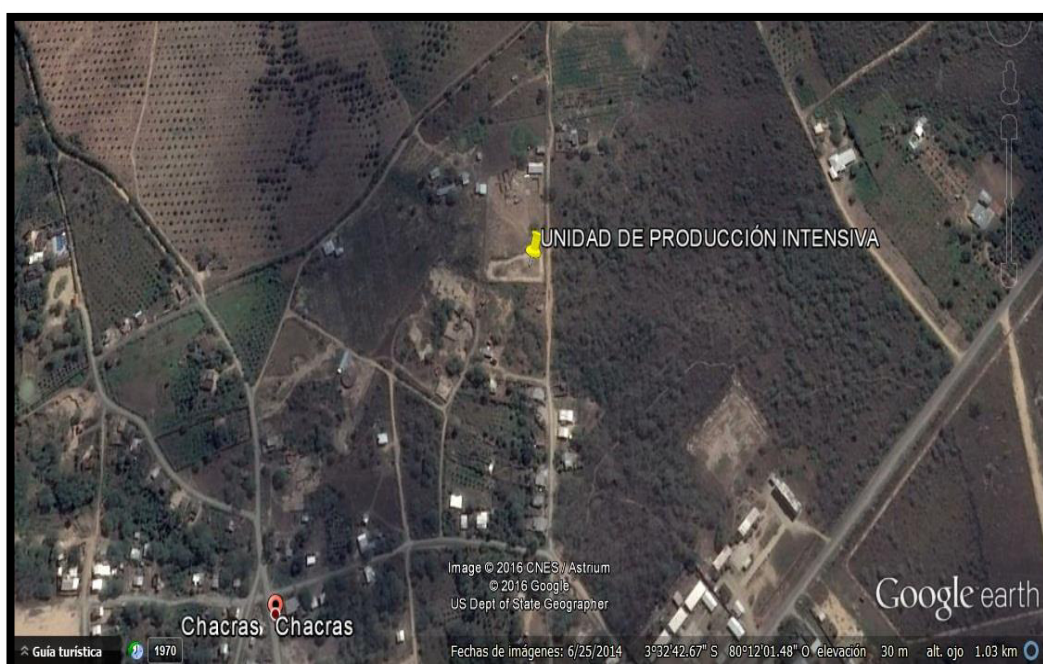
## ANEXOS

**Anexo1.** Mapa satelital del área de captación de la microbiota del mangle rojo en el estuario del rio CHaguana (El Oro-Ecuador).



Fuente. Google Earth. Tesis doctoral. Torres W. UTMachala. 2016

### **Anexo 2. Zona de unidad de producción intensiva CAMARCIELO 03°32'42.72" S y 80°12'02.28" O**





### **Anexo 3. Reservorio de abastecimiento de agua de pozo profundo**



### **Anexo 4. Piscinas de Oxidación y Sedimentación**



### **Anexo 5. Piscinas de cría y engorde de camarón blanco**



### **Anexo 6. Producción de microbiota bioaumentada con melaza previo la aplicación para la biorremediación del agua**

